



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**Entwicklung einer optimalen Aufarbeitungsmethode für
Lignane im Leinsamen unter Betrachtung von gerösteten und
ungerösteten Proben.**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin: Sigrid Reimer
Matrikel-Nummer: 0307034
Studienrichtung: Ernährungswissenschaften
Betreuer: Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag

Gaweinstal, am 15. Dezember 2008

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag bedanken, unter dessen Leitung diese Arbeit entstanden ist.

Weiters danke ich Dr. Heidi Schwartz für etliche Stunden großzügiger Unterstützung und für viele wertvolle Tipps und Anregungen.

Danken möchte ich auch Ao. Univ. Prof. Dr. Emmerich Berghofer und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Universität für Bodenkultur, Wien, Abt. Lebensmitteltechnologie für das Bereitstellen der Proben und die kooperative Zusammenarbeit im Bezug auf das Rösten.

Auch meinen Kolleginnen in unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit wirklich danken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich im Laufe meines Studiums finanziell aber auch moralisch unterstützt haben.

Zum Schluss ein großes Dankeschön an einen Freund für sein Verständnis meinem Studium und auch dieser Arbeit gegenüber.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<i>Einleitung und Zielsetzung</i>	1
2	<i>Literaturübersicht</i>	3
2.1	Phytoöstrogene	3
2.1.1	Isoflavone	4
2.1.2	Coumestane	5
2.1.3	Lignane	5
2.1.3.1	Säugetierlignane	7
2.1.3.2	Metabolismus der Lignane	8
2.1.3.3	Biosynthese von Lignan	9
2.1.3.4	SDG im Leinsamen	10
2.1.4	Gesundheitliche Aspekte der Phytoöstrogene	11
2.1.4.1	Östrogene und antiöstrogene Effekte	11
2.1.4.2	Antikarzinogene Wirkung der Phytoöstrogene	12
2.1.4.3	Stimulation der Produktion des SHBG	14
2.1.4.4	Hemmung von koronaren Herzerkrankungen (KHK)	14
2.1.4.5	Antioxidative Wirkungen der Phytoöstrogene	15
2.2	Methoden zur Untersuchung der Lignane	16
2.2.1	Extraktionsmethoden für Lignane	17
2.2.2	Hydrolysemethoden	18
2.2.2.1	Saure Hydrolyse	18
2.2.2.2	Alkalische Hydrolyse	18
2.2.2.3	Enzymatische Hydrolyse	19
2.2.2.4	Kombinationen der sauren bzw. alkalischen Hydrolyse mit der enzymatischen Hydrolyse	19
2.2.3	Thermische Stabilität der Lignane	22
2.2.4	Resümee und Folgerungen	25
3	<i>Theoretische Grundlagen</i>	26
3.1	Chromatographie	26
3.1.1	Hochdruckflüssigkeitschromatographie – HPLC	26
3.1.1.1	Normalphasen-HPLC	29
3.1.1.2	Reversed-Phase-HPLC	29

3.2	Chromatographische Trennung und ihre Parameter.....	30
3.3	Massenspektrometrie	33
3.3.1	Arbeitsweise.....	33
3.3.1.1	Probeneinlasssystem und Ionisierung	34
3.3.1.2	ESI – Elektrospray Ionisation.....	35
3.3.1.3	Massenanalysatoren.....	36
3.3.1.4	Ionenfallen (Ion-Traps)	38
3.3.1.5	Tandemmassenspektrometrie	39
3.3.1.6	Detektoren	40
4	Material und Methoden.....	41
4.1	Reagenzien, Proben und Substanzen.....	41
4.1.1	Reagenzien.....	41
4.1.2	Proben	41
4.1.3	Standardsubstanzen.....	41
4.1.4	Herstellung der Standardlösungen	44
4.1.5	Geräte	44
4.1.5.1	HPLC-UV-MS	44
4.1.5.1.1	Stationäre Phase	45
4.1.5.1.2	Mobile Phase	45
4.1.5.2	Allgemeine Laborausrüstung	45
4.1.6	Methoden	47
4.1.6.1	Qualitative und quantitative Analyse	47
4.1.6.1.1	Kalibration	47
4.1.6.1.2	Nachweisgrenzen (LOD – Limit of detection)	48
4.1.6.1.3	Erfassungsgrenze (LOQ - Limit of quantitation)	48
4.1.6.1.4	LOD und LOQ der Proben	49
4.1.6.2	Reproduzierbarkeit	49
4.1.6.2.1	Intraday-Reproduzierbarkeit	49
4.1.6.2.2	Interday-Reproduzierbarkeit	49
4.1.6.3	Analyse von Lignanen	49
4.1.6.3.1	Probenbereitstellung	50
4.1.6.3.2	Probenbehandlung.....	50
4.1.6.3.3	Extraktion	50
4.1.6.3.4	Enzymatische Hydrolyse.....	52
4.1.6.3.5	Optimierung der enzymatischen Hydrolyse	53
4.1.6.3.6	Bewertung der durchgeführten analytischen Methoden.....	53
5	Ergebnisse und Diskussion.....	54

5.1	Trennung und Detektion eines Standardgemisches	54
5.2	Erstellen von Kalibrierfunktionen	55
5.2.1	Linearer Bereich	55
5.2.2	Nachweisgrenze (LOD – Limit of detection)	57
5.2.3	Erfassungsgrenze (LOQ – Limit of quantitation)	57
5.2.4	LOD und LOQ der Probe	57
5.3	Reproduzierbarkeit	58
5.3.1	Intraday Reproduzierbarkeit gemessen in Standardlösungen.....	58
5.3.2	Interday-Reproduzierbarkeit gemessen in Standardlösungen.....	59
5.4	Analyse von Lignanen	60
5.4.1	Behandlung der Proben	60
5.4.2	Qualitative Analyse	61
5.4.3	Quantitative Analyse	62
5.4.3.1	Ermittlung der optimalen Aufarbeitungsmethode.....	62
5.4.3.1.1	Extraktion mit Ethanol/Wasser im Ultraschallbad	63
5.4.3.1.2	Extraktion mit Ethanol/Wasser im Ultraschallbad und anschließender enzymatischer Hydrolyse	64
5.4.3.1.3	Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natronlauge.....	67
5.4.3.1.4	Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natronlauge + enzymatische Hydrolyse	71
5.4.3.1.5	Wiederfindung nach der Extraktion mit Natronlauge und anschließender enzymatischen Hydrolyse	76
5.4.3.1.6	Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natriummethoxid und anschließender enzymatischer Hydrolyse	81
5.4.3.1.7	Methodenvergleich	86
5.4.3.2	Optimierung der enzymatischen Hydrolyse	89
6	Schlussbetrachtung	91
7	Zusammenfassung	93
8	Summary	95
9	Literaturverzeichnis.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gehalt an Lignanen in ausgewählten Lebensmitteln [SMEDS et al., 2007]	6
Tabelle 2: Standardsubstanzen	41
Tabelle 3: MRM-Einstellungen im Isolierungs- und Fragmentierungsmodus;.....	47
Tabelle 4: Konzentrationen der Urstandards	48
Tabelle 5: Konzentrationen der Urstandards im Gemisch 1:10 verdünnt.....	48
Tabelle 6: Nachweisgrenzen (LOD) der Lignane	57
Tabelle 7: Erfassungsgrenzen (LOQ) der Lignane	57
Tabelle 8: Nachweisgrenzen und Erfassungsgrenzen der Proben (n.d. = nicht detektierbar) .	58
Tabelle 9: Intraday-Reproduzierbarkeit von Standardsubstanzen durch Messungen der Peakflächen	59
Tabelle 10: Interday-Reproduzierbarkeit von Standardsubstanzen durch Messungen der Peakflächen.....	59
Tabelle 11: Angaben über die Röstbedingungen	60
Tabelle 12: Fettgehalt in % im ungeschroteten Leinsamen.....	61
Tabelle 13: Vergleich der Retentionszeiten der Standardlösungen mit jenen der Probe nach alkalisch-enzymatischer Hydrolyse (n.d. = nicht detektierbar).....	61
Tabelle 14: Eichfunktionen von SECO, LARI und PINO	65
Tabelle 15: k von SECO umgerechnet auf k' von SDG	69
Tabelle 16: Konzentration von SDG nach alkalischer Extraktion und die daraus errechneten SECO Werte.....	69
Tabelle 17: Wiederfindung und Gehalt an ISO im Leinsamen	77
Tabelle 18: Wiederfindung und Gehalt an SECO im Leinsamen	78
Tabelle 19: Wiederfindung und Gehalt an LARI im Leinsamen.....	79
Tabelle 20: Wiederfindung und Gehalt an PINO im Leinsamen.....	80
Tabelle 21: Einfluss der Enzyme auf die Freisetzung der Lignane	89
Tabelle 22: Einfluss der Enzyme auf die Freisetzung der Lignane	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel des weiblichen Sexualhormons 17- β -Östradiol [KULLING und WATZL, 2003]	3
Abbildung 2: Strukturformeln der wichtigsten Isoflavone [KULLING und WATZL, 2003]	4
Abbildung 3: Strukturformeln der wichtigsten Coumestane [KULLING und WATZL, 2003]	5
Abbildung 4: Strukturformeln der Lignanuntergruppen [MILOVANOVIC, 2007]	6
Abbildung 5: Strukturformeln pflanzlicher Lignane [KULLING und WATZL, 2003]	7
Abbildung 6: Strukturformeln von Enterodiol (1) und Enterolacton (2) [MILOVANOVIC, 2007].	8
Abbildung 7: Biosyntheseweg von Lignanene [RAFFAELLI et al., 2002]	10
Abbildung 8: Überblick über die oben erwähnten Extraktions- und Hydrolysemethoden	21
Abbildung 9: Aufbau einer HPLC-Anlage [OTTO, 1995]	27
Abbildung 10: Allgemeine Beschreibung der Gerätebauteile eines Massenspektrometers [SKOOG und LEARY, 1992]	34
Abbildung 11: Tröpfchenbildung durch Elektrospray Ionisation [modifiziert vom Bruker Daltonics Handbuch (esquire series/HCT) Version 1.1 2005]	36
Abbildung 12: Explosion der Tröpfchen am Ray-Limit (wenn die Ladungsgrenze erreicht ist) [modifiziert vom Bruker Daltonics Handbuch (esquire series/HCT) Version 1.1 2005]	36
Abbildung 13: Prinzipieller Aufbau eines Ionenfallenmassenspektrometers [Vorlesungsunterlagen Univ. Prof Dr. Andreas Rizzi, Einführung in die Massenspektrometrie].	39
Abbildung 14: Strukturformeln der Standardsubstanzen	43
Abbildung 15: ESI-MS-Chromatogramm des Standardgemisches	54
Abbildung 16: Kalibriergerade für Isolariciresinol ($m/z = 359.1$)	55
Abbildung 17: Kalibriergerade für Secoisolariciresinol ($m/z = 361.1$)	56
Abbildung 18: Kalibriergerade für Lariciresinol ($m/z = 329.1$)	56
Abbildung 19: Kalibriergerade für Pinoresinol ($m/z = 357.1$)	56
Abbildung 20: ESI-MS-Chromatogramm eines unverdünnten Ethanol/Wasser Extraktes von Leinsamen	63
Abbildung 21: ESI-MS-Chromatogramm eines unverdünnten Ethanol/Wasser Extraktes von Leinsamen und anschließender enzymatischer Hydrolyse	64
Abbildung 22: Freisetzung von SECO beim Rösten	66
Abbildung 23: Freisetzung von LARI beim Rösten	66
Abbildung 24: Freisetzung von PINO beim Rösten	67
Abbildung 25: UV-Chromatogramm von SDG nach alkalischer Extraktion mittels NaOH (1:50 verdünnt mit Acetonitril/Wasser, 20:80; v:v)	68
Abbildung 26: Kalibriergerade von SECO und SDG detektiert bei 280 nm	69

Abbildung 27: Freisetzung von SDG beim Rösten	70
Abbildung 28: ESI-MS-Chromatogramme von den im Leinsamen freigesetzten Lignanen nach einer alkalisch enzymatischen Hydrolyse (NaOH)	71
Abbildung 29: Kalibriergerade von ISO ($m/z = 359.1$)	72
Abbildung 30: Kalibriergerade von SECO ($m/z = 361.1$)	72
Abbildung 31: Kalibriergerade von LARI ($m/z = 329.1$)	72
Abbildung 32: Kalibriergerade von PINO ($m/z = 357.1$)	73
Abbildung 33: Freisetzung von ISO beim Rösten	73
Abbildung 34: Freisetzung von SECO beim Rösten	74
Abbildung 35: Freisetzung von LARI beim Rösten	75
Abbildung 36: Freisetzung von PINO beim Rösten	75
Abbildung 37: Standardadditionsgerade von ISO	76
Abbildung 38: Externe Kalibrierfunktion von ISO	76
Abbildung 39: Standardadditionsgerade von SECO	77
Abbildung 40: Externe Kalibrierfunktion von SECO	77
Abbildung 41: Standardadditionsgerade von LARI	78
Abbildung 42: Externe Kalibrierfunktion von LARI	78
Abbildung 43: Standardadditionsgerade von PINO	79
Abbildung 44: Externe Kalibrierfunktion von PINO	79
Abbildung 45: ESI-MS-Chromatogramme von den im Leinsamen freigesetzten Lignanen nach einer alkalisch enzymatischen Hydrolyse (NaOMe)	81
Abbildung 46: Kalibriergerade von ISO	82
Abbildung 47: Kalibriergerade von SECO	82
Abbildung 48: Kalibriergerade von LARI	82
Abbildung 49: Kalibriergerade von PINO	83
Abbildung 50: Freisetzung von ISO beim Rösten	83
Abbildung 51: Freisetzung von SECO beim Rösten	84
Abbildung 52: Freisetzung von LARI beim Rösten	84
Abbildung 53: Freisetzung von PINO beim Rösten	85
Abbildung 54: Konzentrationen von ISO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe	86
Abbildung 55: Konzentrationen von LARI im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe	86
Abbildung 56: Konzentrationen von SECO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe	87
Abbildung 57: Konzentrationen von PINO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe	87

1 Einleitung und Zielsetzung

Lignane sind polyphenolische Verbindungen, die zur Gruppe der Phytoöstrogene zählen. Sie haben vor allem im letzten Jahrzehnt durch ihre zahlreichen positiven Eigenschaften stark an Bedeutung gewonnen. Lignane üben antioxidative, antivirale, antibakterielle und fungistatische Effekte aus und sind in der Lage, östrogene oder antiöstrogene Wirkungen zu verursachen [ADLERCREUTZ et al., 1997]. Weiters wurde in zahlreichen Studien belegt, dass Lignane unterstützend gegen kardiovaskuläre Erkrankungen wirken und in der Krebsprävention eine entscheidende Rolle spielen [ADLERCREUTZ et al., 1997 und RAFFAELLI et al., 2002].

Lignane sind in einer Vielzahl von pflanzlichen Lebensmitteln enthalten wie z.B.: in Samen, Nüssen, Hülsenfrüchten, Getreide, Obst und Gemüse. Höchste Gehalte wurden im Leinsamen und im Sesam gefunden [MILDER, 2005 und THOMPSON, 2006]. Abhängig von der Pflanze können Lignane als freie Aglycone, glycosidisch gebunden oder verestert vorliegen [KAMAL-ELDIN, 2001; SCHWARTZ et al., 2006 und SMEDS, 2007]. Das Hauptlignan im Leinsamen ist Secoisolariciresinol (SECO), welches sich als Biooligomer bestehend aus SECO-Diglycosid Einheiten, verbunden mit 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure und verestert mit Cumarsäure- und Ferulasäureglycosiden, zusammensetzt.

Zu Beginn der Lignananalyse setzte man hauptsächlich stark saure Hydrolysemethoden ein, um in einem Verfahrensschritt gleichzeitig Esterbindungen und glycosidische Bindungen zu spalten. Es stellte sich jedoch heraus, dass einige Lignane säurelabil sind und dabei entweder zerstört werden, oder zu Abbauprodukten zerfallen. Die basische Hydrolyse wurde schließlich als Alternative zur sauren Hydrolyse eingesetzt, wobei sie nur in der Lage ist, Esterbindungen zu spalten. Um die Glycoside in deren Aglycone zu zerlegen, ist eine anschließende enzymatische Hydrolyse unumgänglich. Wie jedoch SMEDS et al., (2007) schon erwähnten, gibt es keine universelle Aufarbeitungsmethode in der Lignananalytik. Die Analysenmethode hängt von

der Bindungsform des jeweiligen Lignans in den verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln ab.

Viele Lebensmittel werden nicht im Rohzustand, sondern hauptsächlich in verarbeiteter Form verzehrt. Leinsamenmehl wird immer häufiger zum Brotbacken verwendet und ist dadurch Temperaturen von bis zu 250°C ausgesetzt. Der Einfluss der Lebensmittelverarbeitung durch thermische Prozesse auf die Stabilität von fettlöslichen Lignanen in Ölen wurde bereits in einigen Studien untersucht [WEN-HUEY, 2007 und HEMALATHA et al., 2007]. Es existieren jedoch nur wenige Ergebnisse über die Stabilität und Veränderung wasserlöslicher Lignane nach einer Hitzebehandlung.

Das Ziel dieser Arbeit war, eine optimale Extraktions- und Aufarbeitungsmethode für wasserlösliche Lignane im Leinsamen zu finden. Einige bereits publizierte Extraktionsmethoden kamen zum Einsatz, wurden gegebenenfalls optimiert und miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde die Stabilität von wasserlöslichen Lignanen während Röstprozessen zwischen Temperaturen von 100°C-250°C getestet und untersucht, ob Ester- bzw. glycosidische Bindungen eventuell vor der Zerstörung durch Hitzeeinwirkungen schützen oder inwiefern sich die Konzentrationen der gerösteten Proben im Bezug auf die Ausgangskonzentrationen in den ungerösteten Proben verändern.

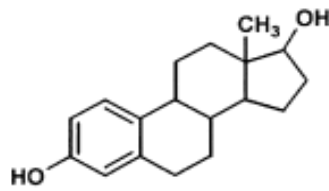
2 Literaturübersicht

2.1 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind im Pflanzenreich vorkommende Polyphenole, welche keine einheitliche Stoffgruppe darstellen. Es werden unter diesem Begriff Substanzen zusammengefasst, die auf der Phenolstruktur basieren [WATZL und LEITZMANN, 1999].

Phytoöstrogene werden im Wesentlichen in drei Strukturklassen, nämlich in Isoflavone, Lignane und Coumestane unterteilt.

Ihre gemeinsame biologische Eigenschaft ist ihre östrogene Aktivität, was letztendlich auch zur Namensgebung geführt hat. Sie üben eine ähnliche Wirkung aus, wie die vom tierischen Organismus synthetisierten Östrogene. Das beim Menschen wichtigste Östrogen ist das weibliche Keimdrüsenhormon 17- β -Östradiol (Abb. 1.), welches auch als Follikelhormon bezeichnet wird und den Menstruationszyklus regelt.



17 β -Östradiol

Abbildung 1: Strukturformel des weiblichen Sexualhormons 17- β -Östradiol [KULLING und WATZL, 2003]

Es wirkt spezifisch auf die weiblichen Geschlechtsorgane, die Brustdrüsen und auf bestimmte Zentren im Zwischenhirn, wo auch die Rezeptoren für 17- β -Östradiol lokalisiert sind [WATZL und LEITZMANN, 1999]. Durch Interaktion mit den Östrogenrezeptoren (ER) können Phytoöstrogene die physiologische Wirkung dieses endogenen Steroidhormons nachahmen bzw. blockieren [KULLING und WATZL, 2003]. Verglichen mit steroidalen Östrogenen, sprich 17- β -Östradiol, besitzen Phytoöstrogene nur 0,1% der östrogenen Wirkung

[STEINMETZ und POTTER, 1991b]. Allerdings können sie im Körper bzw. im Urin des Menschen in einer 10 - 1.000fach höheren Konzentration vorliegen als die endogen gebildeten Östrogene. Je nachdem wie hoch der endogene Östradiolspiegel ist, können Phytoöstrogene deshalb sowohl eine östrogene als auch eine antiöstrogene Wirkung ausüben [ADLERCREUTZ, 2007].

2.1.1 Isoflavone

Isoflavone unterscheiden sich von den pflanzlichen Flavonen durch die Position der Verknüpfung des Chromon- und Phenylrings. Man findet sie überwiegend in der Familie der Schmetterlingsblütler (Fabaceae) und hier vor allem in den Hülsenfrüchten (Leguminosae) [KULLING und WATZL, 2003]. Die Sojabohne stellt die wichtigste Nahrungsquelle dar, wobei man die höchsten Gehalte an Isoflavonen in der Samenschale findet. Sie ist besonders reich an Genistein, Daidzein und Glycitein. Zwei weitere, vereinzelt in Lebensmitteln vorkommende Isoflavone sind Formononetin und Biochanin A. Weiters kommen Isoflavone im Rotklee, Klee- und Alfalfasprouen vor. Isoflavone liegen in der Pflanze meist als Glycoside vor. Während der Verarbeitung gehen nur geringe Mengen an Isoflavonen verloren. Aus fermentierten Sojaprodukten wie etwa Miso können die Isoflavone besser aufgenommen werden, da Mikroorganismen während der Fermentation den Zuckerrest enzymatisch abspalten. Laut REINLI und BLOCK (1996) kann das Aglykon leichter resorbiert werden als die Isoflavonglycoside [KULLING und WATZL, 2003; WATZL und LEITZMANN, 1999].



Abbildung 2: Strukturformeln der wichtigsten Isoflavone [KULLING und WATZL, 2003]

2.1.2 Coumestane

Coumestane spielen eine untergeordnete Rolle in der menschlichen Ernährung, da sie nur in sehr wenigen Pflanzen z.B. in Alfalfa-, Klee-, und Sojasprossen enthalten sind. Coumestrol ist ihr wichtigster Vertreter und besitzt von allen bisher bekannten Phytoöstrogenen die stärkste östrogene Wirkung [ADLERCREUTZ et al., 1997].

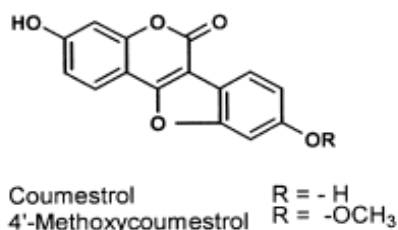


Abbildung 3: Strukturformeln der wichtigsten Coumestane [KULLING und WATZL, 2003]

2.1.3 Lignane

Der Begriff Lignane leitet sich von dem lateinischen Wort *lignum* (Holz) ab und wurde von HAWORTH (1936) eingeführt. Lignane besitzen eine dimere Struktur und bestehen aus zwei C₆-C₃-Körper (Phenylpropaneinheiten), die über das mittlere β-C-Atom verbunden sind. Unterschiedliche Strukturvarianten ergeben sich durch Anordnung und Verknüpfung der C₃-Seitenketten. Abhängig davon, wie das Sauerstoffatom in das Kohlenstoffgerüst eingebaut ist und wie die Cyclisierung stattgefunden hat, ergeben sich *sieben Lignan-Untergruppen*: Dibenzylbutane, Furane, Furofurane, Dibenzylbutyrolactone, Aryltetraline, Arylnaphtaline und Dibenzocyclooctadiene [UMEZAWA, 2003].

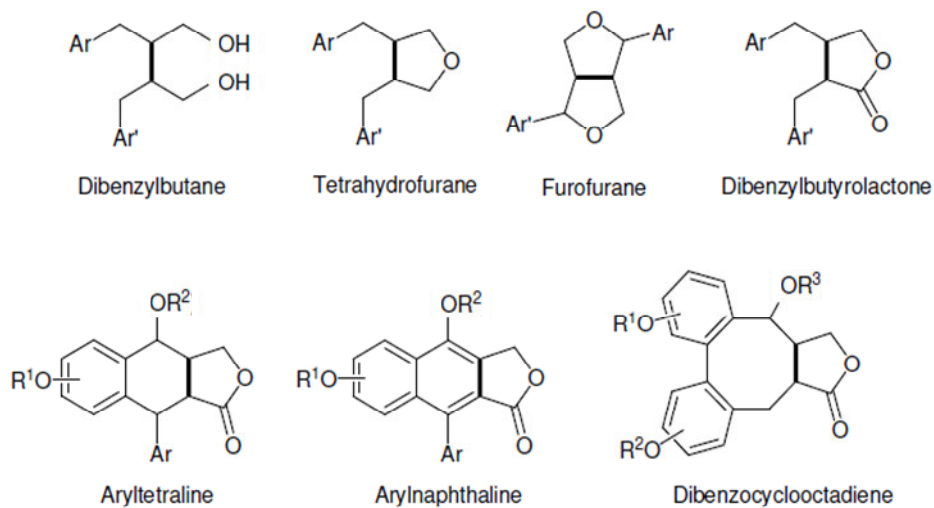


Abbildung 4: Strukturformeln der Lignanuntergruppen [MILOVANOVIC, 2007]

Im Gegensatz zu den Isoflavonen zählen Lignane zu den nicht-flavonoiden Polyphenolen und sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Sie bilden die Ausgangssubstanz für den Zellwandbestandteil Lignin. Hauptnahrungsquellen für Lignane stellen Vollkornprodukte und Ölsaaten dar. Weiters findet man Lignane auch im Obst und Gemüse, in Hülsenfrüchten, Tee, Kaffee und Wein [MILDER et al., 2005 und THOMPSON et al., 2006].

Die mit Abstand höchsten Konzentrationen an Lignanen enthält Leinsamen (siehe Tab. 1).

Gehalt an Lignan in µg/100 g							
Lebensmittel	SECO	PIN	LAR	HMR	SYR	ISO	MAT
Leinsamen	165759	871	1780	35	48	3726	529
Sesam	240	47136	13060	7209	205	1775	1137
Roggen	462	1547	1503	1017	3540	99	729
Weizen	868	138	672	2787	882	54	410
Hafer	90	567	766	712	297	60	440
Japan. Reis	39	503	757	17	967	66	ND
Cashew Nüsse	316	19	307	31	26	147	55
ND = nicht bestimmt							

Tabelle 1: Gehalt an Lignan in ausgewählten Lebensmitteln [SMEDS et al., 2007]

Secoisolariciresinol (SECO), Matairesinol (MAT) und Lariciresinol (LAR) sind die wichtigsten Vertreter der pflanzlichen Lignane und auch bisher am besten erforscht. Daneben wurden einige weitere Lignane wie Pinoresinol (PIN), Isolariciresinol (ISO) auch Cyclariciresinol genannt, 7-Hydroxymatairesinol (HMR) und Syringaresinol (SYR) identifiziert [MILDER et al., 2004].

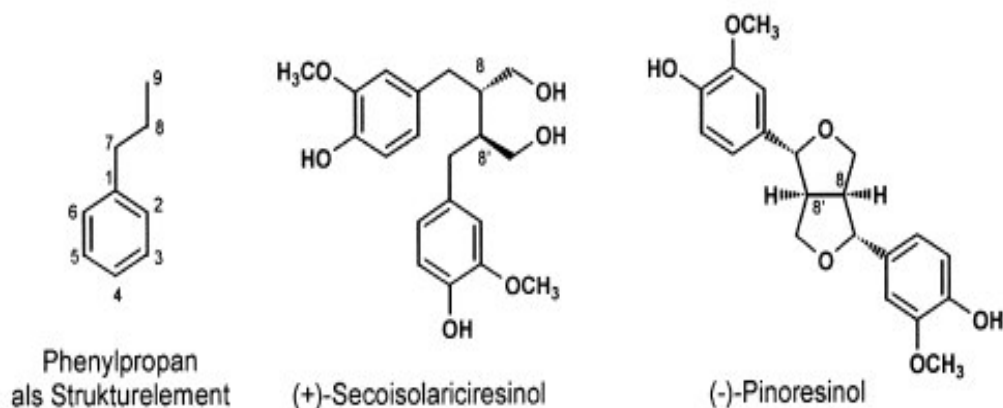


Abbildung 5: Strukturformeln pflanzlicher Lignane [KULLING und WATZL, 2003]

2.1.3.1 Säugetierlignane

Säugetierlignane wurden erstmals im Jahre 1979 von zwei parallel arbeitenden Forscherteams aus Finnland und Großbritannien entdeckt. Anschließend wurde das Interesse an diesen Phytohormonen immer größer und löste eine Welle von Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet aus [SETCHELL und ADLERCREUTZ, 1979]. Prinzipiell bestehen Lignane aus C-Atom-Skeletten, die miteinander auf unterschiedlichste Weise verknüpft sind. Säugetierlignane findet man aber nur in drei verschiedenen Lignan-Typen, die sich in den Oxidationsstufen voneinander unterscheiden: die Dibenzylbutyrolactone, die Dibenzylbutandiole und die Dibenzyltetrahydrofurane. Säugetierlignane, welche man auch Enterolignane nennt, wurden erstmals im Urin des Mannes [STITCH et al., 1980; SETCHELL et al., 1980a] und des Affen [SETCHELL et al., 1980b] entdeckt. 1981 fand schließlich die genaue Identifikation der Struktur von trans-3,4-Bis(3-hydroxybenzyl)-2-furanon namens *Enterolacton (ENL)* und 2,3-Bis(3-

hydroxybenzyl)-butan-1,4-diol namens *Enterodiol (END)* statt [SETCHELL et al., 1981].

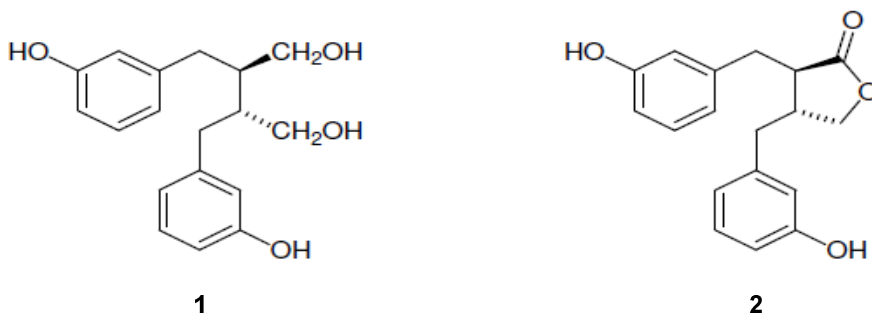


Abbildung 6: Strukturformeln von Enterodiol (1) und Enterolacton (2) [MILOVANOVIC, 2007]

Viele Studien beweisen, dass ENL und END im menschlichen Plasma, in der Speichelflüssigkeit, im Urin und Fäzes zu finden sind. ENL wurde auch reichlich im menschlichen Sperma und der Prostata nachgewiesen [RAFFAELLI et al., 2002].

2.1.3.2 Metabolismus der Lignane

Lignane liegen in der Natur hauptsächlich glycosidisch gebunden bzw. verestert vor. In dieser Form können sie jedoch aufgrund ihres hydrophoben Charakters kaum vom Dünndarm resorbiert werden. Daher werden im Darm, durch Enzyme der Darmflora, β -glycosidische Verbindungen sowie Esterbindungen gespalten und daraus resultieren Aglycone [ADLERCREUTZ et al., 1997]. Nach dieser Spaltung werden die Aglycone der pflanzlichen Lignane fast vollständig ebenfalls bakteriell in ENL und END umgewandelt bevor sie resorbiert werden [SETCHELL und ADLERCREUTZ, 1988]. PIN wird zu LAR umgebaut und weiters zu SECO und MAT metabolisiert, welche dann anschließend zu END umgewandelt werden. END wird abschließend zu ENL oxidiert. SYR, welches reichlich im Roggen vorhanden ist, wird ebenfalls in Enterolignane umgewandelt. MAT und HMR werden direkt in ENL und 7-Hydroxyenterolacton (HENL) umgewandelt. Noch vor einigen Jahren kannte man nur zwei Vorstufen von Säugetierlignanen, nämlich SECO und MAT. Heute sind sowohl HMR und Arctigenin (ARC) als Vorstufen von Enterolignanen identifiziert worden. Bei ISO

findet keine Umwandlung in END und ENL statt [ADLERCREUTZ, 2007]. Weiters wurde durch ausgedehnte Studien festgestellt, dass Secoisolariciresinol-Diglycosid (SDG) ebenfalls eine Vorstufe von ENL ist [THOMPSON et al., 1991]. ENL und END werden schließlich im Gastrointestinaltrakt absorbiert und erreichen die Leber, wo sie durch hepatische Phase-II Enzyme (UDP Glucuronosyltransferase und Sulfotransferase) mit Glucuronsäure und Schwefelsäure verbunden werden und schließlich in den Blutkreislauf gelangen. Lignane werden hauptsächlich als Monoglucuronide über den Urin ausgeschieden, nur sehr kleine Mengen erscheinen als Diglucuronide und Sulfate im Urin. Über den Stuhl werden nur ungebundene, freie Lignane ausgeschieden. Es scheint jedoch so, dass der Lignanmetabolismus in jedem Individuum etwas variiert. NESBITT et al. (1999), LAMPE et al. (1994) und ROWLAND et al. (2000) berichteten über große Schwankungen im Bezug auf die Exkretion von ENL und END im menschlichen Körper bei unterschiedlichen Probanden [RAFFAELLI et al., 2002].

2.1.3.3 Biosynthese von Lignan

Lignane leiten sich vom Phenylpropan-Zyklus ab, sie entstehen durch oxidative Dimerisierung aus Phenylpropanen [AXELSON und SETCHELL, 1980].

Im Jahr 1990 gelang es einem Forscherteam aus der Pflanze *Forsythia sp.* die Biosynthese von Lignan aufzuklären. Der Strukturaufbau beginnt bei der Aminosäure L-Phenylalanin und setzt sich aus einer Sequenz von fünf hintereinander folgenden enzymatischen Reaktionen zusammen: einer Desaminierung, einer aromatischen Hydroxylierung, einer Methylierung und einer CoA-vermittelten und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-abhängigen (NADPH) Reduktion, wodurch schließlich L-Phenylalanin über die Zimtsäure, Cumarsäure, Kaffeesäure und Ferulasäure zu Coniferylalkohol umgewandelt wird.

Weiters entsteht schließlich in Anwesenheit von Laccase und Sauerstoff PIN, woraus durch das Enzym Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR) in Kombination mit NADPH Pinoresinol zu Lariciresinol umwandelt und dieses

stufenweise zu SECO reduziert wird. Mit Hilfe des Enzyms Secoisolariciresinoldehydrogenase (SIRD) wird schließlich SECO zu MAT oxidiert (siehe Abb. 7) [RAFFAELLI et al., 2002].

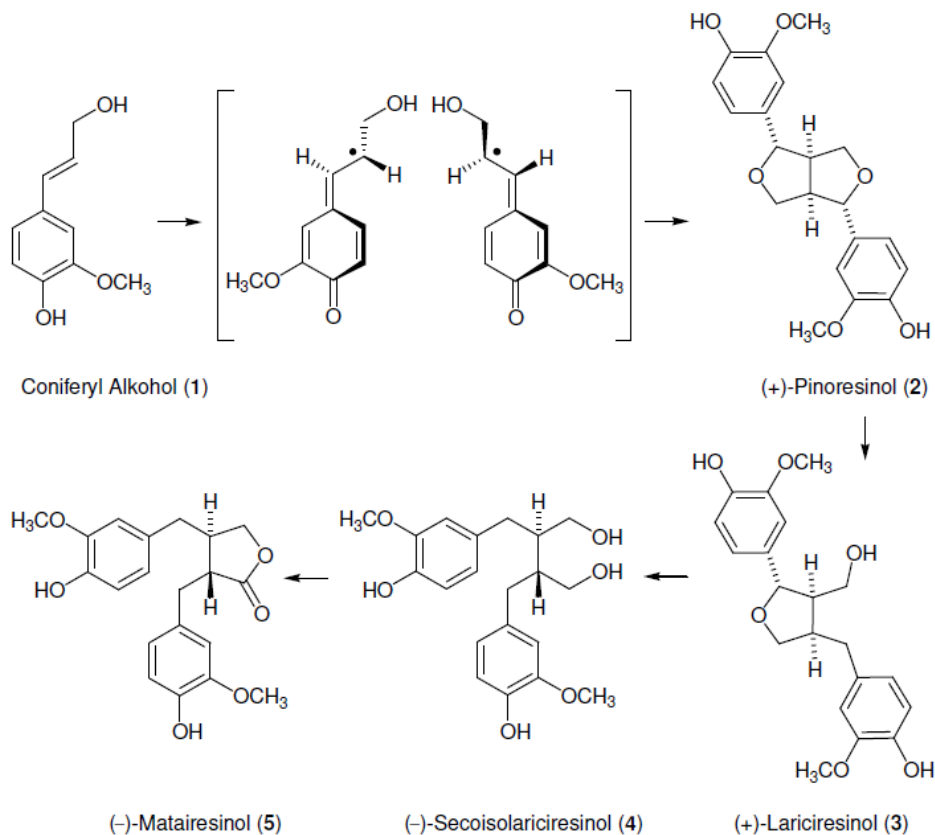


Abbildung 7: Biosyntheseweg von Lignanen [RAFFAELLI et al., 2002]

2.1.3.4 SDG im Leinsamen

Leinsamen (lat. *Linum usitatissimum*) ist ein sehr interessanter Rohstoff für die Lebensmittelproduktion, denn er stellt eine wertvolle Quelle für Omega-3-Fettsäuren, Ballaststoffe und Lignane, vor allem Secoisolariciresinol-Diglycosid (SDG), dar. Leinsamen wird sowohl zu Brot, Kekse, Müsli und Cerealien zugesetzt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verarbeitung zu einem sehr hochwertigem Öl dar. Auch in gerösteter Form wird diese nährstoffreiche Saat vor allem in der östlichen Welt vielen Speisen beigemischt. SDG wird nach der Nahrungsaufnahme in die Enterolignane END und ENL umgewandelt, was eine

Menge von positiven gesundheitlichen Aspekten mit sich bringt [THOMPSON et al., 1996]. Im Gegensatz zu den meisten Pflanzen, wo Lignane oftmals in freier Form vorkommen, liegen sie im Leinsamen als Oligomere vor und bilden sehr komplexe Makromoleküle [KAMAL-ELDIN et al., 2001].

Das ergiebigste Lignan im Leinsamen ist SDG, welches mit Hydroxymethylglutarsäure (HMGA) verestert die Basis des Lignan-Makromoleküls darstellt [KAMAL-ELDIN et al., 2001]. Weitere Bestandteile dieses Makromoleküls sind das Herbacetin-Diglycosid (HDG) und die Hydroxyzimtsäurederivate p-Cumarsäureglycosid (CouAG) und Ferulasäureglycosid (FeAG), welche über Esterbindungen ausgehend von deren Carboxylgruppe an Zuckerreste des SDG gebunden sind [STRUJIS et al., 2008].

2.1.4 Gesundheitliche Aspekte der Phytoöstrogene

Das Auftreten von Krankheiten wie Brust-, Prostata- und Dickdarmkrebs sowie koronare Herzerkrankungen und auch hormonabhängige Krankheiten kommen in den westlichen Ländern im Vergleich zu Asien viel häufiger vor. Zahlreiche Studien ergaben, dass der westliche Lebensstil und die Ernährungsweise die Ursache dafür sind. Der Verzehr an Phytoöstrogenen ist in einer asiatischen pflanzenreichen Kost wesentlich höher im Vergleich zu einer fleisch- und fettreichen aber ballaststoffarmen westlichen Ernährungsform. Nun möchte ich gerne den Zusammenhang zwischen der Aufnahme der Phytoöstrogene und deren gesundheitliche Effekte näher erläutern.

2.1.4.1 Östrogene und antiöstrogene Effekte

Studien ergaben, dass die Isoflavone Daidzein, Genistein, Equol und O-Desmethylangolensin sowie die Lignane ENL und END schwache östrogene Wirkungen zeigen. Sie beeinflussen den Hormonstoffwechsel bzw. die Hormonproduktion und binden entweder an Östrogenrezeptoren (ER) oder blockieren diese, wodurch die Östrogenantwort ausbleibt. Je nach Konzentration üben sie demnach eine östrogene oder antiöstrogene Wirkung aus [MESSINA et al., 1991]. Es existieren sehr sorgfältig durchgeführte Studien über die Östrogenaktivitäten in Gewebeskulturen, im Speziellen in

Brustkrebszellen. Lignane wirken in Kombination mit Tamoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator, hemmend auf Östrogenrezeptoren und stimulierend auf Progesteronrezeptoren. Folglich wurde die Östrogenaktivität in diesen Gewebeskulturen gehemmt [JORDAN et al., 1985].

Östrogene stimulieren das Gebärmutterwachstum bei Ratten, indem sie die RNA-Synthese steigern. Eine niedrige RNA-Synthese spricht demnach für eine verminderte Östrogenaktivität. Laut TANG und ADAMS (1980) wird die Wachstumsrate der Gebärmutter verringert, wenn man Östradiol gemeinsam mit Equol verabreicht. In einer weiteren Studie wurde bewiesen das ENL in vivo bei Ratten die östrogenstimulierende RNA-Synthese in der Gebärmutter hemmt, wenn es 22 Stunden vor Östradiol verabreicht wurde [WATERS und KNOWLER, 1982]. Wenn Genistein in physiologischen Konzentrationen von 0,5 μM zu sich genommen wird, verringert es die Bindung von Östradiol an den Rezeptor um 50%. Dies lässt darauf schließen, dass Genistein und Östradiol ebenfalls um die Bindung an den Östrogenrezeptor konkurrieren [WANG et al., 1996].

2.1.4.2 Antikanzerogene Wirkung der Phytoöstrogene

Phytoöstrogene wirken laut ADLERCREUTZ (1990a) der Krebsentstehung entgegen. ENL hemmt die Enzyme 5- α -Reduktase und 17- β -Dehydrogenase, welche für das Wachstum der Prostata essentiell sind. Die Plasmawerte an freiem Östradiol und Testosteron sinken und die Wahrscheinlichkeit an hormonabhängigen Tumoren zu erkranken wird dadurch geringer [ADLERCREUTZ et al., 1987]. Weiters hemmt ENL das Wachstum von östradiolstimulierenden MCF-7 Brustkrebszellen in vitro [MOUSAVI und ADLERCREUTZ, 1992].

Östradiol wird in Östron und anschließend über 16- α -Hydroxyöstron zu Östriol umgewandelt. Eine hohe Konzentration an Östriol wird als Risikofaktor für Brust- und Gebärmutterschleimhautkrebs angesehen [ADLERCREUTZ et al., 1992b]. An einer Studie mit finnischen Frauen wurde der Zusammenhang zwischen Brustkrebsrisiko, Hormonstatus und Ernährungsweise aufgrund ihrer SHBG-Plasmakonzentration (SHBG: Sexualhormon-bindendes Globulin –

Transportprotein für Testosteron und Östradiol) und der 16- α -Hydroxyöstron Ausscheidung im Urin getestet. Frauen mit Brustkrebs und Normalkost zeigten die höchsten Werte für Östriol und die niedrigsten für SHBG [ADLERCREUTZ, 1990a].

Laut Studien wurde angenommen, dass Phytoöstrogene auch die Kanzerogenaktivierung hemmen können. Es wurde in vitro festgestellt, dass ENL an das aktive Zentrum der Cytochrom-P450-abhängigen Enzyme bindet und die Aktivierung des Prokanzerogens hemmt [SETCHELL und ADLERCREUTZ, 1988]. In einer Interventionsstudie mit postmenopausalen Brustkrebspatienten (n=19), reduzierte eine tägliche Aufnahme von Leinsamen über Monate die Expression von Tumorzellen-Marker (Ki-67 und c-erbB2) und erhöhte die Apoptose (Zelltod) [THOMPSON et al., 2005].

Die nützlichen Effekte von Leinsamen gegen Brustkrebs sind auf SDG zurückzuführen. Ratten, bei denen schon tumorassoziierte Gene nachgewiesen wurden, hat man mit SDG-reichen Futter versorgt. Das Auftreten von Tumoren wurde seltener und die Ausbreitung von Metastasen nach chirurgischen Eingriffen zur Entfernung von bereits vorhandenen Tumoren wurde ebenfalls reduziert [THOMPSON et al., 1996a und CHEN et al., 2006].

Weiters besteht ein Zusammenhang zwischen phytoöstrogenreicher Nahrung sowie hohen ENL-Plasmakonzentrationen und einem verminderten Risiko an Prostatakrebs zu erkranken. Es wurden verschieden hohe Dosen von phytoöstrogenhaltiger Kost verabreicht und festgestellt, dass das Risiko einer Erkrankung zwischen der höchsten Aufnahme an Phytoöstrogenen und der niedrigsten um 26% gesenkt werden konnte [HEDELIN et al., 2006].

Eine Beeinflussung des Gallensäurestoffwechsels bedeutet eine Beeinflussung der Dickdarmkrebsentstehung, da sekundäre Gallensäuren laut Studien an der Dickdarmkrebsentstehung beteiligt sind. ENL und END hemmen in vitro die Aktivität von Cholesterin-7 α -hydroxylase. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Bildung von primären Gallensäuren aus Cholesterin, welche dann weiter von der Dickdarmflora zu sekundären Gallensäuren umgewandelt werden. Mit einer Hemmung des Enzyms sinkt auch das Risiko für Dickdarmkrebs [THOMPSON et al., 1996].

2.1.4.3 Stimulation der Produktion des SHBG

Das SHBG (Sex-Hormone-Binding-Globulin) ist ein Protein, das in der Leber gebildet wird. Es ist in der Lage im Plasma Geschlechtshormone zu binden. Je höher die Konzentration an SHBG ist, desto geringer ist diese an freien aktiven Östrogenen und Androgenen [ADLERCREUTZ, 1990a und ADLERCREUTZ, 1991b]. Aufgrund einiger Studien wird angenommen, dass Isoflavone und Lignane die Synthese von SHBG in der Leber stimulieren. Besonders bei ENL konnte man eine Steigerung an SHBG feststellen, wenn es gemeinsam mit Östradiol verabreicht wurde [ADLERCREUTZ et al., 1992b].

In einer Studie mit finnischen Frauen korreliert die Plasma-Konzentration an SHBG mit der Ausscheidung von Isoflavonen und Lignanzen über den Urin. Auch bei Vegetarierinnen wurden hohe ENL-, Gesamtlignan-, Gesamtdiphenol- und Gesamtisoflavonausscheidungen über den Urin bei dementsprechend hohen SHBG-Werten im Plasma festgestellt [ADLERCREUTZ et al., 1992a].

Im Gegensatz dazu wurde bei einer Studie mit Probanden, welche eine westliche Mischkost aufwiesen, niedrigere Konzentrationen an SHBG im Blut und auf Grund dessen, erhöhte Konzentrationen an aktiven, freien Geschlechtshormonen nachgewiesen [ADLERCREUTZ et al., 1990a]. In etlichen Studien wurde gezeigt, dass die Aufnahme an Geschlechtshormonen in Organe wie die Leber durch hohe SHBG-Plasmawerte verringert wird [ADLERCREUTZ et al., 1991b].

2.1.4.4 Hemmung von koronaren Herzerkrankungen (KHK)

Koronare Herzerkrankungen sind multifaktoriell. Sie werden mit Risikofaktoren wie erhöhtem Serumcholesterin, Bluthochdruck, Übergewicht und Rauchen in Verbindung gebracht. Lignanen und Isoflavonen wird eine mögliche Rolle zur Vermeidung von KHK nachgesagt [ADLERCREUTZ et al., 1997]. ENL stellt einen Biomarker für eine gesunde, ballaststoffreiche Kost dar. VANHARANTA et al. (1999) berichteten, dass ein vermindertes Risiko an koronaren Herzerkrankungen zu leiden, mit einer hohen ENL-Serumkonzentration einhergeht. Bei einer Aufnahme von Sojaprotein für 4-12 Wochen mit einem

Isoflavongehalt von durchschnittlich 100 mg/d wurde eine Erniedrigung des LDL-Cholesterins und der Serum-Triglyceride und eine Erhöhung des HDL-Cholesterins festgestellt. Ähnliche Effekte konnten auch aus epidemiologischen Studien mit der Aufnahme von Leinsamen bzw. Lignan beobachtet werden, welche in einem Tierversuch mit dem isolierten Lignan SECO bestätigt wurden [KULLING und WATZL, 2003].

2.1.4.5 Antioxidative Wirkungen der Phytoöstrogene

Bei den Isoflavonen ist Genistein das wirksamste Antioxidans, wobei die 4-Hydroxygruppe der Isoflavone als Radikalfänger fungiert [RUIZ-LARREA et al., 1997]. Genistein hemmt die Bildung von Wasserstoffperoxid und Superoxidanion sowie die dadurch ausgelösten oxidativen Schäden, womit sich teilweise die antikanzerogenen Eigenschaften erklären lassen [WEI et al., 1993 und RECORD et al., 1995]. Oxidative DNA-Schäden werden von Genistein entweder durch dessen Bindung an bestimmte Stellen der DNA, oder durch das Abfangen des Superoxidanions verhindert. Weiters wird die Aktivität antioxidativer Enzymsysteme durch Genistein erhöht [WEI et al., 1996].

Bei einer Studie erhielten Erwachsene für zwei Wochen täglich drei Sojariegel mit 12 mg/d Genistein und 7 mg/d Daidzein. Es wurden anschließend der Isoflavongehalt und die Oxidierbarkeit von LDL-Partikel (low density lipoprotein), welche man aus dem Plasma isoliert hat, bestimmt. Ihre Oxidierbarkeit war signifikant verringert, was man darauf zurückführte, dass die LDL-Partikel von den Isoflavonen so verändert wurden, dass sie resistenter gegen Oxidation waren [TIKKANEN et al., 1998].

In einer weiteren Studie wurde eine Plasmid DNA gemeinsam mit Fenton Reagens (löst DNA Spaltung aus) und SDG, ENL und END inkubiert. Durch die Einwirkung der Lignane konnte eine DNA-Spaltung vermieden werden [WANG, 2002].

2.2 Methoden zur Untersuchung der Lignane

Isoflavone und Lignane kommen in der Natur hauptsächlich als Glukonjugate vor. Entweder die Zuckerreste der Ligannglycoside oder die Lignanaglycone selber können zusätzlich noch verestert sein [KAMAL-ELDIN et al., 2001 und BAMBAGIOTTI et al., 1994]. Qualitative und quantitative Bestimmungen von Lignanen verlangen nach gezielten Spaltungen der Esterbindungen unter Erhaltung der Ligannglycoside. Allerdings für eine alleinige Quantifizierung müssen sowohl Esterbindungen als auch glycosidische Bindungen gebrochen werden, um den reinen Aglycongehalt zu bekommen. Für eine Strukturaufklärung weiterer bis dato noch unbekannter Lignane sind Informationen über die Pflanzenphysiologie, deren Bioverfügbarkeit und die Hydrolysebedingungen wichtig, sowie das Wissen darüber, an welchen Stellen die einzelnen Verbindungen solcher Makromoleküle verknüpft sind. In diesem Bereich der Lignanforschung spielen analytische Methoden, eine sehr gewissenhafte Probenvorbereitung als auch Extraktion und der Einsatz von immer wieder neuen Technologien eine entscheidende Rolle.

SDG im Leinsamen ist in natürlicher Form mit 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure verestert und bildet ein Oligomer [KAMAL-ELDIN et al., 2001]. Eine geeignete Methode für die Quantifizierung des Diglycosids musste gefunden werden. Dazu mussten die Esterbindungen gespalten werden, um das Diglycosid zu erhalten. Bei der sauren Hydrolyse werden sowohl Esterbindungen als auch Glycoside gespalten. Die basische Hydrolyse führt nur zur Spaltung von Esterbindungen und eignet sich daher gut für die Quantifizierung von SDG. Es wurden einige Möglichkeiten der basischen Hydrolyse in der Literatur beschrieben. RICKARD et al., (1996) schlugen folgende Abfolge vor: Extraktion der Probe, Eindampfen des Lösungsmittels, Methanolyse mit Natriummethoxid, pH-Anpassung, zwei Reinigungsschritte über Silica-Gel Filtration, wodurch SDG isoliert wurde. ELIASSEN et al. (2003) entwickelten eine Methode, um den Extraktionsschritt und die Methanolyse mit Natriummethoxid gleichzeitig durchführen zu können, mit anschließender Ansäuerung der Probe und Ausfällung von Polysacchariden und Proteinen mit 60%igen Ethanol. Eine effizientere und schnellere Probenbehandlung wurde dadurch möglich.

Es ist von großer Bedeutung, wenn man die im natürlichen Lebensmittel vorkommenden nativen Formen der Lignane kennt, denn dies beeinflusst die Entscheidung über die Hydrolysemethoden enorm. Im Fall von SDG im Leinsamen erreicht man ein Freisetzen der Glycoside aus Komplexen am besten durch eine milde alkalische Hydrolyse oder eine Methanolyse. Es wurden bisher zahlreiche Methoden für die quantitative Analyse der Lignane in Lebensmitteln veröffentlicht. Ihre Anwendungen richten sich nach der strukturellen Vielfalt von Lignanen im Pflanzenreich. Sie unterscheiden sich in der Art der Hydrolyse, der Extraktionsdauer, in der Verwendung verschiedener Lösungsmittel und in den Auftrennungs- und Detektionsmethoden. Oft differieren die Gehalte an Lignanen in ein und demselben Lebensmittel enorm, was auf die unterschiedlich durchgeführten Analyseprozeduren zurückzuführen ist. Im Anschluss möchte ich näher auf die Analyse der Lignane, beginnend mit der Extraktion bis zur Detektion der einzelnen Substanzen eingehen.

2.2.1 Extraktionsmethoden für Lignane

Der Extraktionsschritt kann entweder vor oder gemeinsam mit der Freisetzung der Aglycone aus deren nativer Form erfolgen und dient der Abtrennung von nicht polaren Substanzen wie z.B. Fetten von polaren Substanzen. Die Wirksamkeit der Extraktion ist abhängig von der Widerstandsfähigkeit der Zellen, welche die Zielsubstanzen im Lebensmittel enthalten, sowie der Wechselwirkung mit der Probenmatrix. Die meisten Methoden basieren auf der Behandlung mit polaren organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril (ACN), Methanol (MeOH) oder Ethanol (EtOH) oder Mischungen der eben genannten Substanzen mit Wasser. Ausgewählt wird das Lösungsmittel abhängig von der Polarität der Analyte. Verstärkt wird der Extraktionseffekt noch durch Temperaturbeeinflussungen oder mechanische Beeinflussungen, wie etwa Extraktion im Ultraschallbad bei erhöhten Temperaturen, Extraktion im Wasserbad bei erhöhten Temperaturen oder Extraktion im Wasserbad unter Rühren bei erhöhten Temperaturen. Folgt nach der Extraktion eine enzymatische Hydrolyse, so muss das alkoholische Lösungsmittel im Rotavapor oder mit Stickstoff abgedampft werden, um die Enzyme nicht zu

zerstören. Um die Extraktionsausbeute zu steigern, eignen sich aggressivere Hydrolyse-methoden wie die saure oder alkalische Hydrolyse [LIGGINS et al., 2000 und ELIASSON et al., 2003].

2.2.2 Hydrolysemethoden

2.2.2.1 Saure Hydrolyse

Die effizienteste aber auch aggressivste Hydrolysemethode ist die saure Hydrolyse, mit der sowohl Esterbindungen als auch glycosidische Bindungen in einem Schritt gespalten werden. MAZUR et al., (1996) und LIGGINS et al., (2000) machten bei der Bestimmung von SECO und MAT Gebrauch von dieser Hydrolysemethode. Es stellte sich jedoch schnell heraus, dass manche Lignane säurelabil sind und durch die aggressive Säurebehandlung zu Abbauprodukten zerfallen oder von einem in ein anderes Lignan umgewandelt werden oder im schlimmsten Fall sogar zerstört werden. Dadurch ist es nicht mehr möglich, den Gesamtignangehalt zu bestimmen [SMEDS et al., 2007].

PENALVO et al., (2005) modifizierten schließlich die von MAZUR et al., (1996) entwickelte Methode und senkten die Säurekonzentration von 2.0 auf 0,6 M, um mildere Bedingungen zu schaffen. Obwohl die saure Hydrolyse als die stärkste Form der Hydrolysemethoden gesehen wird, berichteten MEAGHER et al., (2000), dass sie nicht ausreichend für die Freisetzung von Lignan aus Getreidekleie war. Sie kombinierten diese Methode schließlich mit einer enzymatischen Hydrolyse mit Hemicellulose-Enzymen.

2.2.2.2 Alkalische Hydrolyse

Die basische Hydrolyse stellt im Bezug auf die Spaltung von Esterbindungen eine gute Alternative zur sauren Hydrolyse dar. Es gibt zwei verschiedene Arten der alkalischen Hydrolyse, die bisher angewendet wurden: Methanolyse mit Natriummethoxid (NaOMe) oder Hydrolyse mit einer wässrigen Lösung aus Natriumhydroxid (NaOH) [KRAUSHOFER et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2006; PENALVO et al., 2005; MILDER et al., 2004; SMEDS et al., 2007]. SECO ist unter alkalischen Bedingungen stabil, während die Stabilität von MAT unter

alkalischen Bedingungen nicht gegeben ist. Da die alkalische Hydrolyse nicht in der Lage ist Glycoside zu spalten, muss sie mit einer zweiten Hydrolysemethode, der enzymatischen Hydrolyse, kombiniert werden.

2.2.2.3 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse ist die mildeste Form der Hydrolyse. Die Proben werden mit einer wässrigen Pufferlösung unter Zusatz des Enzyms und dem Enzym betreffenden optimalen Bedingungen (bezüglich pH-Wert und Temperatur) behandelt. Häufig eingesetzte Enzyme für die Hydrolyse von Lignanglycosiden sind Cellulase [KRAUSHOFER et al., 2002 und LIGGINS et al., 1998] und β -Glucuronidase/Sulfatase (von *Helix pomatia* juice) [MAZUR et al., 1996]. Durch den Einsatz der Enzyme können Glycoside zu Aglyconen gespalten werden. Es kommt in pflanzlichen Lebensmitteln häufig vor, dass analoge Aglycone in verschiedenen Glycosiden gebunden sind. Aus diesem Grund sollte vorher die Wirksamkeit der verwendeten Enzyme in jedem Lebensmittel spezifisch getestet werden. Ein Enzym, welches Lignanglycoside im Leinsamen spaltet, kann durchaus nicht in der Lage sein, Glycoside im Getreide zu spalten, da möglicherweise die Bindung eine andere sein könnte.

2.2.2.4 Kombinationen der sauren bzw. alkalischen Hydrolyse mit der enzymatischen Hydrolyse

Einer Studie zu Folge ist die Lignankonzentration in Getreidekleie nach einer Kombination aus saurer und enzymatischer Hydrolyse höher als nach einer alleinigen Anwendung der sauren Hydrolyse [MEAGHER et al., 2000]. Dies wird durch spezielle Enzyme erklärt, die einen gezielten Abbau von Zellen in der Aleuronschicht im Getreide verursachen. Um diesen Effekt mit der sauren Hydrolyse alleine erzielen zu können, müsste man unter sehr sauren Bedingungen arbeiten, was wieder zu einer Reihe von Abbauprodukten führen würde. Laut KRAUSHOFER et al., (2002) zerfällt SECO zu Anhydrosecoisolariciresinol (anhydroSECO), wenn man mit einer 1 M Salzsäure arbeitet.

Die alkalische Hydrolyse allein spaltet nur Esterbindungen. Um den Gesamtglycongehalt zu bekommen, ist eine anschließende enzymatische Hydrolyse unumgänglich. Sollte es sich um alkalisch instabile Lignane handeln, ist es besser die mildere Methanolyse mit NaOMe zu wählen, um diverse Lignane nicht zu zerstören. Eine Kombination von alkalischer bzw. saurer Hydrolyse mit HCl bzw. NaOH und anschließender enzymatischer Hydrolyse wurde von MILDNER et al., (2004); PENALVO et al., (2005) und SMEDS et al., (2007) durchgeführt. Die Proben wurden in 70% Methanol mit 0,3 M NaOH für eine Stunde bei 60°C extrahiert, anschließend neutralisiert, das Lösungsmittel wurde eingedampft und die Extrakte wurden mit einer wässrigen Acetatpufferlösung versetzt, schließlich mit Enzym (*Helix pomatia*) vermischt und über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die saure Extraktion wurde analog durchgeführt und anstelle von NaOH wurde 0,01 M HCl verwendet.

Je nachdem welche Lignane im Lebensmittel vorhanden sind und wie diese strukturell gebunden sind, wählt man individuell für jedes Produkt eine passende Extraktionsmethode, um eine vollständige Quantifizierung der Glycongehalte möglich zu machen. In Abb. 8 sind noch einmal alle möglichen Extraktions- und Hydrolysemethoden, welche es erlauben, Lignane zu quantifizieren, zusammengefasst.

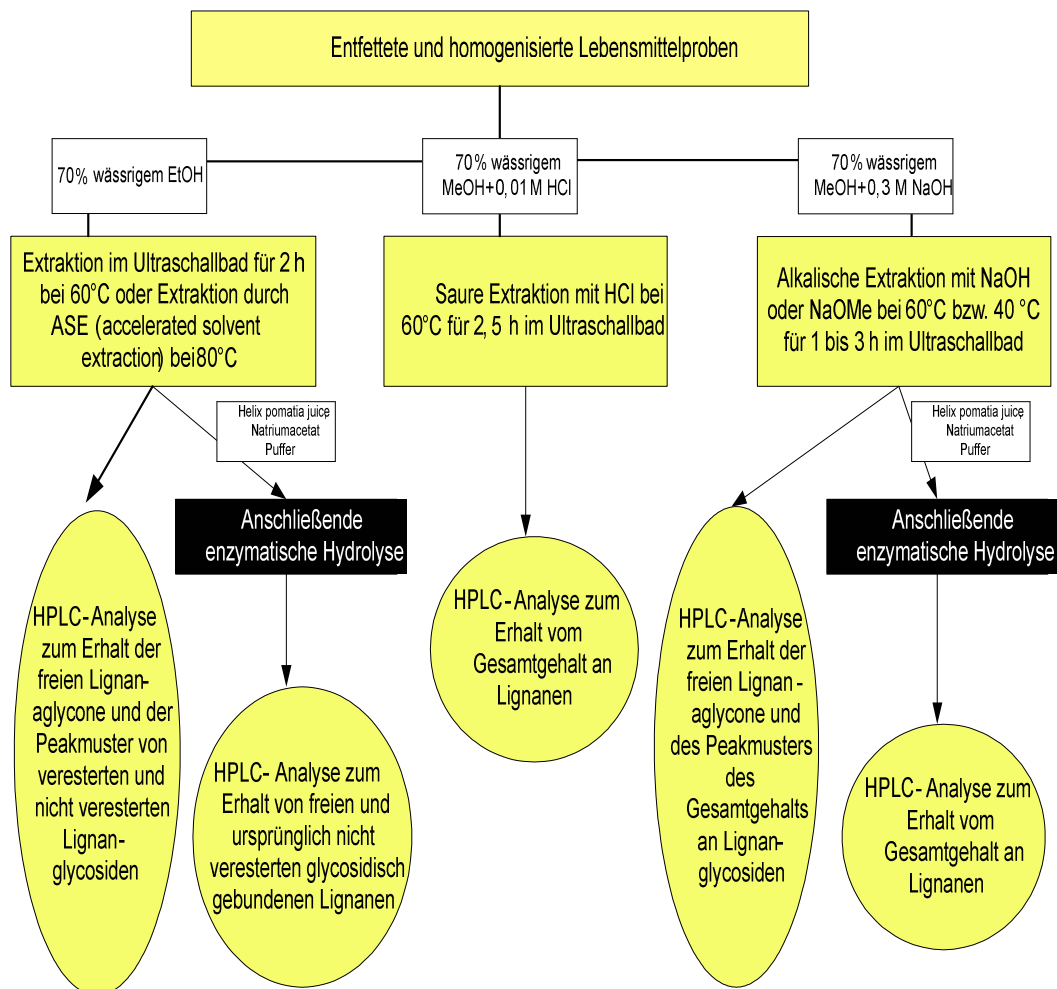


Abbildung 8: Überblick über die oben erwähnten Extraktions- und Hydrolysemethoden

2.2.3 Thermische Stabilität der Lignane

Es gibt auf diesem Forschungsgebiet nur einige wenige Studien, welche sich mit dem Einfluss einer thermischen Behandlung auf die Lignanstabilität, sowie deren Stabilität während längeren Lagerzeiten, beschäftigen.

BRENES et al., (2002) machten Versuche mit 2 verschiedenen Sorten von nativem Olivenöl. Die Öle wurden zum einen in der Bratpfanne und in der Mikrowelle erhitzt und zum Anderen mit Wasser in einem Druckkochtopf gekocht und anschließend auf deren Polyphenolstabilität geprüft. Die Temperaturerhöhung bis auf 180°C während des Bratprozesses verursachte eine signifikante Konzentrationsabnahme von Hydroxytyrosol und tyrosolähnlichen Substanzen. Es kam ebenfalls zu einem rapiden Abbau von α -Tocopherol und den Glyceridfraktionen im Öl. Im Gegensatz dazu blieben jedoch die im Olivenöl natürlich vorhandenen Lignane 1-Acetoxypinoresinol und PIN nach einer Hitzeinwirkung von 25 Stunden weitgehend erhalten. Es waren nur geringe Verluste zu verzeichnen.

Eine Mikrowellenerhitzung von 10 min hatte gar keinen Einfluss auf die Lignanstabilität. Anschließend wurde eine bestimmte Menge an Olivenöl gemeinsam mit Wasser in einem Druckkochtopf für 30 min gekocht, gleichzeitig variierte man den pH-Wert von 4-6. Da Lignane einen höheren lipophilen Charakter aufweisen als Tyrosol und Hydroxytyrosol verblieben noch nach dem Kochprozess eine große Menge an 1-Acetoxypinoresinol und PIN in der Ölphase. Der Rest ging durch Diffusion, unabhängig vom pH-Wert, in die Wasserphase über. Die Abnahme des Gesamtlignangehalts betrug nach dem Kochen 30%. Es wurde abschließend der Lignangehalt dieser Öle nach einem Jahr Lagerung überprüft, und dabei festgestellt, dass er sich kaum von der Ausgangskonzentration unterschied.

In einer weiteren Studie wurde die Lignanstabilität im Sesamöl nach thermischen Behandlungen getestet. Es ergab sich keine Änderung des Lignangehalts nach einer Erhitzungsphase von 4 min auf 180°C. Allerdings stieg die Konzentration an Sesamol nach einer Erhitzungsdauer von 20 min auf 180°C deutlich an während der Gehalt an Sesamolin abnahm. Ab einer

Temperatur von 200°C und einer Erhitzungsdauer von 20 Minuten kam es zu einer signifikanten Abnahme von Sesamolin und Sesamol [WEN-HUEY, 2007]. Überdies wurde der Effekt von Sesam-Lignanen auf die thermische Stabilität der pflanzlichen Öle, wie Sojabohnenöl, Sonnenblumenöl und Reiskornöl durch die Bestimmung der Radical scavenging activity (RSA) unter Verwendung von DPPH (2,2 Diphenyl-1-picryl hydrazyl), einem stabilen freien Radikal, getestet. Die Öle wurden mit Sesamin und Sesamolin versetzt, um vor einer oxidativen Alterung durch freie Radikale zu schützen und in Folge dessen die Dosis an DPPH zu senken. In früheren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Sesamöl mit höheren Konzentrationen an Sesamin und Sesamolin eine höhere Haltbarkeit aufweist. Nach der Erhitzung der Öle auf Brattemperaturen bis zu 180°C wurde das Lignanprofil bestimmt. Bis zu 74% an Sesamolin blieben nach einer Erhitzungsdauer von 120 min in den angereicherten Ölen erhalten. Die Konzentration an Sesamol erreichte ihr Maximum nach 60 min und verschwand allmählich nach einer Erhitzungsdauer von 120 min auf 180°C. Die Aufrechterhaltung an Sesamin lag zwischen 70-90% nach einer Erhitzungsperiode von 120 min auf 180°C, was somit bestätigt, dass Sesamin am hitzeresistentesten ist. Es wird sehr häufig gegen Fettsäureoxidation durch freie Radikale eingesetzt. Es waren deutlich niedrigere Konzentrationen an DPPH in mit Lignanen angereicherten Ölen zu verzeichnen als in Ölen ohne Lignanzusatz [HEMALATHA, 2007].

Weiters gibt es eine Studie, welche sich mit der Stabilität an SDG in thermisch behandelten Milchprodukten auseinandersetzt. Yoghurt, Milch und Edamer Käse wurden mit isoliertem SDG versetzt und anschließend pasteurisiert (75-90°C) bzw. fermentiert. Es kam zu kaum registrierbaren Konzentrationsänderungen an SDG nach der Pasteurisation und auch der Einfluss von Milchsäurebakterien und Bifidobakterien während der Fermentation führte zu keinen Gehaltseinbußen an SDG. Diese Ergebnisse brachten die Erkenntnis, dass Milch- und Milchprodukte erfolgreich mit SDG angereichert werden können und somit der gesundheitliche Nutzen enorm gesteigert werden kann [HYVÄRINEN, 2006].

MURKOVIC et al., (2004) testeten die Stabilität von SECO in Kürbiskernen nach Röstprozessen. Kürbiskerne wurden bei 150°C für 10,20,30,40 und 50 min geröstet, anschließend entfettet und einer 2-Stufen Extraktion, bestehend aus einer Methanolyse mit NaOMe und einer darauf folgenden enzymatischen Hydrolyse mittels Cellulase, unterzogen. Die Konzentrationen an SECO sanken nach 10 min von 3,8 µg/g auf 2,8 µg/g. Ab einer Röstdauer von 20 min war SECO nicht mehr detektierbar, es wurde unter diesen Röstbedingungen zerstört.

2.2.4 Resumee und Folgerungen

Zusammenfassend lässt sich sagen:

- dass es keine universelle Aufarbeitungsmethode in der Lignananalytik gibt und diese von der Bindungsform des jeweiligen Lignans in den verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln abhängt.
- dass die HPLC in Kombination mit verschiedenen Detektoren (UV-Absorption, coulometrischer Elektrodenarray, Massenspektrometrie (ESI-MS)) die Methode der Wahl ist und die Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie seltener eingesetzt wurde.
- dass bisher fast ausschließlich Lignananalysen von Rohprodukten durchgeführt wurden. Erst in den letzten Jahren wurde die thermische Stabilität fettlöslicher Lignane untersucht, um abschätzen zu können, ob diese auch in zubereiteten Lebensmitteln erhalten bleiben.

Leinsamenmehl wird immer häufiger zum Brotbacken verwendet und ist dadurch Temperaturen von bis zu 250 °C ausgesetzt. Deswegen stellt sich die Frage, ob dieses an wasserlöslichen Lignanreichen Lebensmittel eine Einbuße an Lignan bei der Verarbeitung (Röstung, Backen) erleidet.

Ziel dieser Arbeit war, eine optimale Analysenmethode basierend auf HPLC-ESI-MS für wasserlösliche Lignane zu entwickeln. Dazu sollte eine optimale Extraktions- und Aufarbeitungsmethode ausgearbeitet werden, die es gestattet, Aussagen über den Bindungszustand dieser Lignane im Leinsamen zu machen. Weiters sollte die thermische Stabilität der wasserlöslichen Lignane beim Rösten im Temperaturbereich zwischen 100 und 250 °C getestet werden.

Überdies sollte auch geklärt werden, ob Ester- bzw. glycosidische Bindungen die Lignane vor einer Zerstörung durch Hitzeeinwirkung schützen und wie hoch der Verlust an Lignan bei der Röstung ist.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Chromatographie

Durch chromatographische Methoden ist man in der Lage sehr ähnliche Verbindungen aus komplexen Gemischen zu trennen. Die Inhaltsstoffe der Proben werden in gelöster Form der chromatographischen Trennung mit einer mobilen Phase unterzogen. Bei der mobilen Phase handelt es sich entweder um eine Flüssigkeit, ein Gas oder eine überkritische Flüssigkeit. Die stationäre Phase befindet sich entweder in einer Säule oder an einer festen Oberfläche fixiert und ist mit der mobilen Phase nicht mischbar. Bei der Auftrennung wird die mobile Phase durch die stationäre Phase hindurchbewegt, wodurch sich die Probenkomponenten in unterschiedlichem Maße zwischen der stationären und mobilen Phase verteilen. Komponenten, die von der stationären Phase stark zurückgehalten werden, bewegen sich nur langsam mit der mobilen Phase weiter und umgekehrt. Aufgrund der entstehenden Mobilitätsunterschiede trennen sich die Probenkomponenten auf und es ist sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Analyse möglich. Das entstehende Elutionsprofil eines Substanzgemisches in Form von Peaks wird als Chromatogramm bezeichnet [SKOOG und LEARY, 1992].

3.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie – HPLC

Es existieren vier Prinzipien zur Trennung mit Hilfe einer flüssigen mobilen Phase:

- Adsorption
- Verteilung
- Ionenaustausch
- Ausschluss

Die Adsorption in Form einer Flüssig-Fest-Chromatographie dient zur Trennung unpolarer Verbindungen wie z.B. aliphatischer Kohlenwasserstoffe und

Alkohole. Mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Chromatographie wird das Prinzip der Verteilung umgesetzt. Man unterscheidet zwischen der Normalphasen- und der Umkehrphasen-Chromatographie. Letztere ist die am häufigsten eingesetzte Trennmethode. Die Ionenaustausch-Chromatographie wird als Übertragung des klassischen Ionenaustausches im „Batch-Verfahren“ auf die Säulenchromatographie verstanden. Das Ausschlussprinzip findet in der Gelchromatographie seine Anwendung und beruht auf dem Molekularsiebeffekt. Das Sorbens wird so gewählt, dass Verbindungen mit bestimmten Molekülgrößen nicht durch die Poren des Sorbens hindurch können und somit gegenüber kleineren Molekülen ausgeschlossen werden. Die einzelnen Trennprinzipien treten keinesfalls isoliert auf, sondern ergänzen einander und verstärken somit den Grad der Trennung [OTTO, 1995].

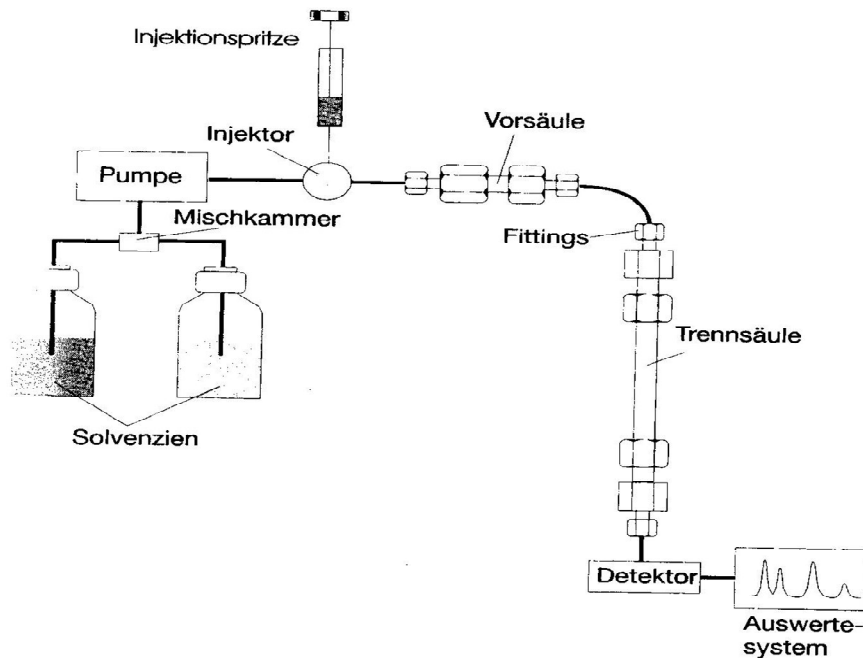


Abbildung 9: Aufbau einer HPLC-Anlage [OTTO, 1995]

Mobile Phasen

Mobile Phasen werden in Glas- bzw. Edelstahlflaschen aufbewahrt und müssen von gelösten Gasen und Schwebstoffen befreit werden, da es sonst zu Störungen im Detektor kommen kann. Am einfachsten werden die Lösungsmittel durch Absaugen unter Vakuum gereinigt oder durch Einleiten eines Edelgases bzw. durch Behandlung im Ultraschallbad.

Es wird zwischen isokratischer Elution und der Gradientenelution unterschieden. Mit einem einzigen Lösungsmittel konstanter Zusammensetzung wird bei der isokratischen Arbeitsweise gearbeitet, jedoch eine bessere Trennung erreicht man durch die Anwendung eines Gradienten. Dabei wird die Zusammensetzung des Eluenten laufend nach einem bestimmten Programm verändert. Es resultieren kürzere Analysezeiten und die Peaks sind mit ähnlicher Präzision auswertbar.

Pumpen

Edelstahl, Teflon und Keramik sind die geeignetsten Materialien für Chromatographiepumpen. Um der hohen Druckbeanspruchung standhalten zu können, werden Saphir-Ventile eingesetzt. Man unterscheidet Langhubkolbenpumpen, welche wie eine Spritze funktionieren und Kurzhubkolbenpumpen, die mit einer Phasenverschiebung arbeiten.

Injektionssysteme

Um den Druck im System zu halten, verwendet man zur Probenaufgabe Dosierschleifen. Die Probenlösung wird mit einer Mikroliterspritze in die Schleife eines Ventils eingeführt und mit Hilfe des zu diesem Zeitpunkt durchfließenden Eluenten direkt in die Säule transportiert. Automatisch arbeitende Probeninjektionssysteme (Autosampler) gewährleisten eine hohe Präzision bei der Probenaufgabe. Sie werden über Druckluftschaltung gesteuert und funktionieren ebenfalls auf Basis der Dosierschleifen.

Trennsäulen

Die Trennsäulen bestehen an ihrer Innenseite bevorzugt aus poliertem Edelstahl oder dickwandigem Glas. Die Verbindungen zu den Rohrleitungen werden über Metaldichtringe (Fittings) hergestellt. Zusätzlich werden kurze Vorsäulen zum Schutz der Trennsäule bzw. für Vortrennungen eingesetzt.

Diese Säulen sind mit Packungsmaterialien mit einem Durchmesser zwischen 3-5 μm gefüllt.

Detektoren

Detektiert wird auf zwei unterschiedliche Weisen:

- Detektion einer Eigenschaft der mobilen Phase, wie deren Leitfähigkeit. Der Analyt wird indirekt über die Veränderung der Eigenschaft der mobilen Phase angezeigt.
- Detektion einer Eigenschaft des Analyts, wie dessen Absorption im UV oder dessen Fluoreszenz.

Am häufigsten, sprich bei 70% aller Anwendungen im chromatographischen Bereich, wird der UV Detektor eingesetzt. Weiters verwendet man Fluoreszenzdetektoren, Refraktometer, elektrochemische Detektoren und massenspektrometrische Detektoren [OTTO, 1995].

3.1.1.1 Normalphasen-HPLC

Bei der NP-HPLC wird eine polare stationäre Phase (z. B. Silicagel/Kieselgel) genutzt, welche in Wechselwirkung mit einer unpolaren mobilen Phase tritt (Ether, Hexan). Polare Moleküle werden auf der Säule länger retardiert als unpolare (lipophile, hydrophobe) Moleküle und verlassen deshalb die Säule später [OTTO, 1995].

3.1.1.2 Reversed-Phase-HPLC

Die RP-HPLC, auch Umkehrphasen-Chromatographie genannt, ist in der Praxis die gängigste Methode. Die stationäre Phase besteht zumeist aus Silanen, welche mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituiert wurden und schließlich mit Silicagel in Reaktion gebracht wurden. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Alkanen überzogen, also die Polarität umgekehrt. Als mobile Phase eignen sich Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol. Besondere Anwendung findet die RP-HPLC bei der Auftrennung von polaren Analyten, die auf Normalphasen zu hohe Retentionszeiten aufweisen würden [OTTO, 1995].

3.2 Chromatographische Trennung und ihre Parameter

Verteilungskoeffizient

Der Verteilungskoeffizient K ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentration des Analyts in der stationären Phase zu der Konzentration in der mobilen Phase. Er ist ein Maß für die Wechselwirkung eines Stoffes mit der stationären Phase. Die Verteilungskoeffizienten zweier Analyte müssen sich voneinander unterscheiden, um eine Trennung zu gewährleisten. Sie können nicht direkt aus dem Chromatogramm abgelesen werden.

$$K = \frac{c_S}{c_M}$$

Es gilt c_S = Konzentration des Analyts in der stationären Phase

c_M = Konzentration des Analyts in der mobilen Phase

K = Verteilungskoeffizient

Retentionszeit

Ein wichtiger Parameter zur chromatographischen Identifizierung der einzelnen Substanzen ist die Retentionszeit t_R . Darunter versteht man die Zeit, welche vom Analyt benötigt wird, um nach der Injektion den Detektor zu erreichen. Die Proben oder die mobile Phase enthalten oft nicht retardierte Substanzen. Solche Substanzen erleichtern die Peakidentifizierung und erreichen als erstes den Detektor. Die Zeit t_M , die nichtretardierte Substanzen bis zum Detektor benötigen, wird als Totzeit bezeichnet. t_S ist jene Zeit, die der Analyt, der in der stationären Phase zurückgehalten wird, bis zum Detektor benötigt.

$$t_R = t_M + t_S$$

Die Totzeit t_M lässt sich aus der Säulenlänge L und der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit u , mit der sich die Moleküle der mobilen Phase bewegen, berechnen.

$$t_M = \frac{L}{u}$$

Wanderungsgeschwindigkeit

Darunter versteht man die Geschwindigkeit, mit der sich Moleküle im Durchschnitt durch die Säule bewegen. Sie hängt von der Länge L , der Säulenpackung sowie der totalen Retentionszeit t_R ab.

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R}$$

Kapazitätsfaktor

Die Retentionszeit einer Substanz ist unter konstanten Bedingungen ein charakteristisches Maß für die qualitative Analyse. Sie wird in eine dimensionslose Größe - den Kapazitätsfaktor k' umgewandelt, um Analysenergebnisse miteinander vergleichen zu können, die unter unterschiedlichen Bedingungen aufgenommen wurden.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Es gilt	t_R	Retentionszeit
	t_M	Totzeit

Selektivität

Je unterschiedlicher der Verteilungskoeffizient zweier Stoffe A und B ist, umso besser ist die Trennung dieser. Abhängig ist der Unterschied der k' - Werte von der Art der stationären Phase. Werden die Substanzen in der stationären Phase

sehr unterschiedlich festgehalten, resultiert eine gute Trennung. Man spricht von einer hohen Selektivität.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

Es gilt Verhältnis α = Trennfaktor

k'_A = Kapazitätsfaktor der zu trennenden Substanz A

k'_B = Kapazitätsfaktor der zu trennenden Substanz B

Auflösung

Die Fähigkeit zwei Peaks a und b voneinander zu trennen, lässt sich durch die chromatographische Auflösung R_s beschreiben. Nur wenn eine Auflösung von > 1 gegeben ist, darf das Chromatogramm zur Quantifizierung verwendet werden. R_s steht im engen Zusammenhang mit dem Kapazitätsfaktor, sowie den Selektivitätsfaktor und lässt sich folgendermaßen definieren:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k'}{1 + k'} \right)$$

Es gilt $N = L / H$ N = Zahl der theoretischen Böden

L = Länge der gepackten Säule

H = Bodenhöhe

α = Selektivität, Trennfaktor

k' = Kapazitätsfaktor

[SKOOG und LEARY, 1992; DOMINIK et al., 2002]

3.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine wichtige und äußerst empfindliche analytische Methode, die dem Nachweis chemischer Verbindungen bis in den Spurenbereich dient, sowie deren Quantifizierung und Strukturermittlung ermöglicht. Mit Hilfe der MS können die genauen atomaren bzw. molekularen Massen von Substanzen bestimmt werden. Einsatz findet diese analytische Methode entweder als reine Massenspektrometrie, um Reinstoffe und Stoffgemische zu untersuchen oder in Form einer „on-line“ Kopplung mit Trennverfahren wie Gaschromatographie (GC) oder HPLC [SKOOG und LEARY, 1992].

3.3.1 Arbeitsweise

Aus einer Probe bzw. einem eingebrachten Analyt wird ein sich rasch bewegender Ionenstrahl im Hochvakuum erzeugt und anschließend werden diese Ionen nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Nachfolgend werden diese mengenproportional aufgetrennten Ionen detektiert und in einem Massenspektrum aufgezeichnet. Aufgrund der erhaltenen Intensitätsverteilung der gemessenen molekularen Massen kann man Rückschlüsse auf den Analyt, dessen Struktur und Konzentration [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005] ziehen.

Ein Massenspektrometer besteht aus folgenden Gerätebauteilen (siehe Abb. 10):

- Probeneinlass und Ionenquelle
- Vakuumpumpen
- Massenanalysator
- Detektor
- Datenverarbeitungssystem

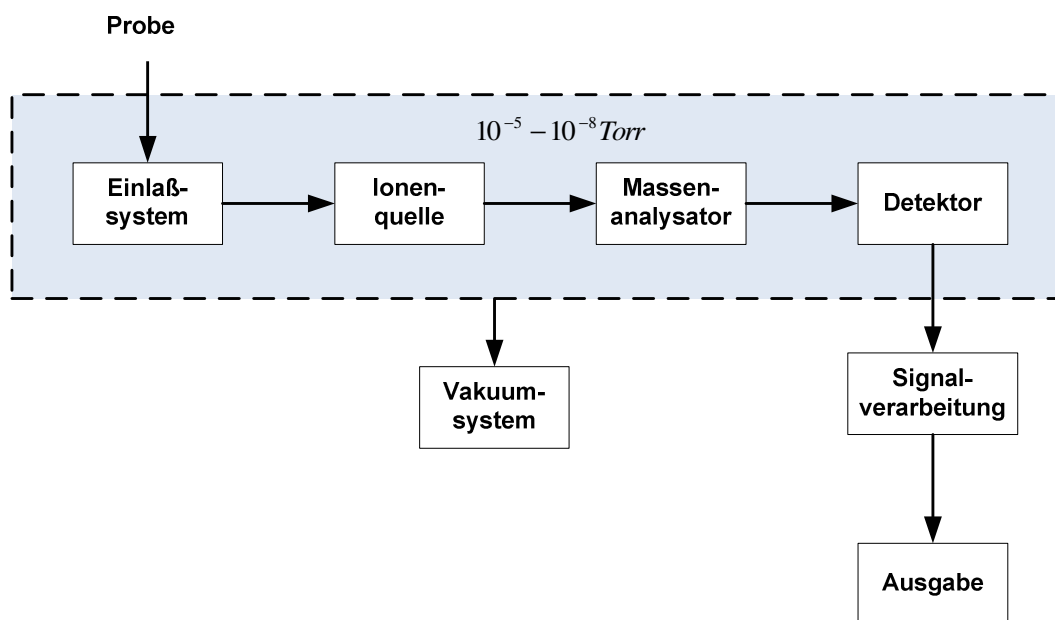


Abbildung 10: Allgemeine Beschreibung der Gerätebauteile eines Massenspektrometers
[SKOOG und LEARY, 1992]

Hauptsächlich liegen die natürlich vorkommenden Elemente als ein Isotopengemisch mit unterschiedlichen atomaren Massen vor, deshalb treten für die molekulare Masse einer Verbindung mehrere Peaks mit verschiedenen m/z Werten auf. Anhand der Intensitätsverteilung dieser Peaks erkennt man die Isotopenhäufigkeit [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

3.3.1.1 Probeneinlasssystem und Ionisierung

Im Einlasssystem werden sehr kleine Probenmengen verdampft und in der unmittelbar anschließenden Ionenquelle ionisiert. In vielen Fällen werden Einlasssystem und Ionenquelle kombiniert, wobei die Reihenfolge verschieden sein kann. Es gibt Einlass- und Ionisierungssysteme für gasförmige, flüssige und feste Proben, sowie direkte Kopplungssysteme mit vorgeschalteten Trennmethode.

Die Ionenquelle eines Massenspektrometers wandelt Probenbestandteile durch Herausschlagen eines Elektrons (Elektronenstoßionisation – EI) oder im Fall der weichen Ionisationsmethoden durch Beschuss mit Atomen (FAB – fast atom bombardment), Ionen (SIMS – Secondary Ion-MS), oder Photonen (MALDI – matrix assisted laser desorption/ionisation) in Ionen um. Alternativ dazu kann

die Ionisierung in Form von elektrischer Energie (ESI – Elektrospray Ionisationstechnik) erfolgen [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

Da wir an unserem Institut mit dieser Form der Ionisation arbeiten, möchte ich auf die prinzipielle Arbeitsweise näher eingehen.

3.3.1.2 ESI – Elektrospray Ionisation

ESI ist die sanfteste Ionisationstechnik, bei der keine Fragmentationen, aber geladene Ionen unterschiedlicher Ladungszahlen entstehen.

Durch das Anlegen eines starken elektrischen Feldes zwischen der Eingangsöffnung der Transferkapillare und der Spitze der Kapillarnadel kommt es zur Bildung eines Sprays. Die Tröpfchen des Sprays sind vielfach geladen und tragen sowohl positive Ladungen durch Anlagerung von Protonen und Kationen an die Analytmoleküle bzw. negative Ladungen durch Abzug von Protonen. Die Tröpfchen werden mit Hilfe eines Heizgases (N_2) solange unterteilt und zerkleinert, bis die Analytmoleküle vollständig desolvatisiert und geladen vorliegen. Der erzeugte Ionenstrom ist abhängig von der Konzentration der Moleküle in der Probe. ESI wird oft mit Trennverfahren wie HPLC gekoppelt und findet unter Atmosphärendruck statt. Sie zählt deshalb zu den API-Techniken (atmospheric pressure ionization) [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

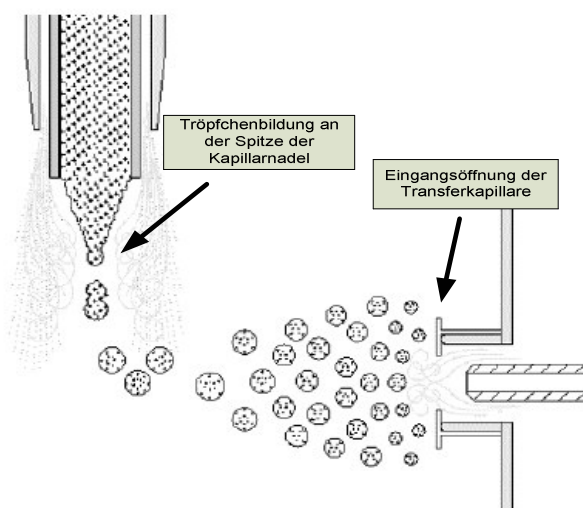


Abbildung 11: Tropfenbildung durch Elektrospray Ionisation [modifiziert vom Bruker Daltonics Handbuch (esquire series/HCT) Version 1.1 2005]

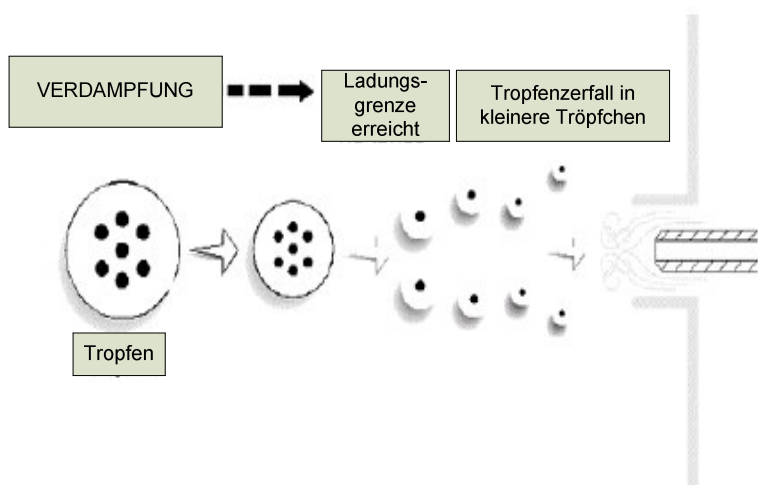


Abbildung 12: Explosion der Tropfen am Ray-Limit (wenn die Ladungsgrenze erreicht ist) [modifiziert vom Bruker Daltonics Handbuch (esquire series/HCT) Version 1.1 2005]

3.3.1.3 Massenanalysatoren

Zur Trennung von Ionen mit unterschiedlichem Masse zu Ladungsverhältnis sind mehrere Methoden verfügbar. Die Massenanalysatoren sollten zwischen geringfügigsten Massendifferenzen unterscheiden können, sowie für eine ausreichende bzw. bestimmte Zahl von Ionen durchlässig sein. Diese beiden Eigenschaften sind oft nur schwer miteinander kombinierbar.

Die Leistungsfähigkeit eines Massenanalysators bzw. dessen Fähigkeit zwischen Massen zu differenzieren, wird in Form seiner Auflösung R (engl. Resolution) beschrieben.

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Es gilt Δm Massendifferenz zwischen zwei benachbarten Signalen
 m Nennmasse des ersten Peaks

Für die Massendifferenz Δm gibt es mehrere Definitionen, je nachdem ob ein Einzelpeak bzw. ein Peakpaar bestimmt wird und um welches Analysatorgerät es sich handelt.

Bei den TOF (Time-of-flight) Analysatoren werden die Ionen anhand ihrer Flugzeit auf einer feldfreien Driftstrecke aufgetrennt. Die Flugzeit bzw. wann sie am Detektor auftreffen, ist abhängig von der Geschwindigkeit der Ionen und diese wiederum ist abhängig von deren m/z Verhältnis. Bei den Sektorfeld-Analysatoren wird ein Elektromagnet verwendet, um den Ionenstrahl von seiner Flugbahn abzulenken. Die Geschwindigkeit der Ionen hängt vom Ablenkungsradius r ab. Üblicherweise ist der Radius des Flugrohres solcher Analysatortypen vorgegeben und bei einer bestimmten Beschleunigungsspannung U und magnetischen Feldstärke B können nur Ionen mit bestimmten m/z Werten den Detektor erreichen. Alle anderen Ionen treffen an den Wänden des Flugrohres auf und entladen sich. Es ist auch ein scannender Betrieb möglich, indem man die magnetische Feldstärke so variiert, dass alle Ionen der Reihe nach den Detektor erreichen. Quadrupol-Massenanalysatoren arbeiten als Massenfilter, sie sind billig, robust, bieten niedrige Scan-Zeiten und sind momentan die am häufigsten eingesetzten Analysatoren. An den Quadrupolstäben entsteht ein elektrisches Feld durch das Anlegen von Gleich- und phasenversetzter Wechselspannung, welches wiederum nur Ionen mit bestimmten m/z Werten auf stabilen Flugbahnen durch das Quadrupolfeld bewegt. Alle anderen Ionen treffen analog dem Sektorfeldanalysator an den

Stäben auf und werden entladen. Auch hier ergibt sich die Möglichkeit eines scannenden Betriebes, indem Gleich- und Wechselspannung so verändert werden, dass nacheinander alle Ionen zeitaufgelöst den Detektor erreichen [SKOOG und LEARY, 1992].

3.3.1.4 Ionenfallen (Ion-Traps)

Man unterscheidet folgende Typen von Ionenfallen:

- Quadrupol-Ionenfalle
- Linear Trap
- Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-MS
- Orbitrap
- MS/MS'

Eine Ionenfalle ist ein Gerät, indem gasförmige Anionen oder Kationen durch eine besondere Anordnung und Geometrie der Ringelektroden sowie durch Überlagerung elektrischer Gleich- und Wechselfelder für längere Zeit eingeschlossen werden können. Ionen mit bestimmten m/z Werten zirkulieren in einer stabilen Umlaufbahn, der sogenannten „Falle“ bis es zu einer Änderung der Hochfrequenzspannung kommt. Schwerere Ionen werden stabilisiert, während leichtere Ionen destabilisiert werden, was durch einen Schwall von Analytione, erzeugt durch Elektronenstoß bzw. Kollision mit Edelgasatomen (He, Ar) erfolgt. Durch kontinuierliche Variation der Wechselspannungen verlassen die eingefangenen Ionen in dem Moment, in dem sie destabilisiert werden, den Raum und gelangen zum Detektor. Ionenfallen werden auch sehr häufig in der Tandem–Massenspektrometrie eingesetzt, da sie in der Falle gesammelte Ionen ausselektieren und gezielt fragmentieren können [BUDZIKIEWICZ und SCHÄFER, 2005].

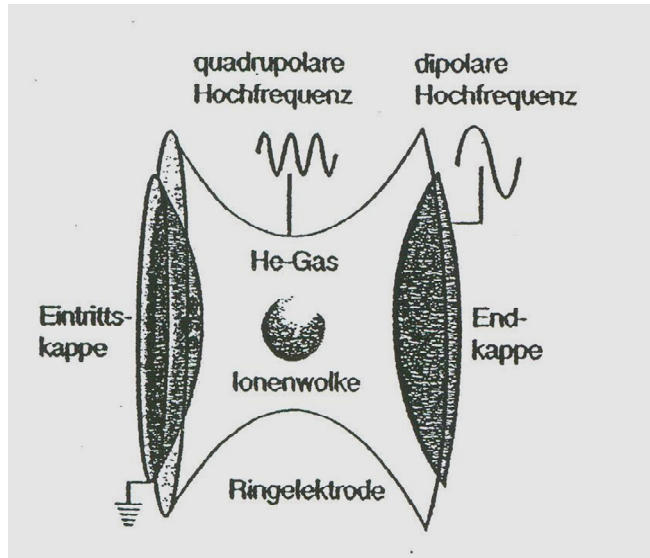


Abbildung 13: Prinzipieller Aufbau eines Ionenfallenmassenspektrometers
[Vorlesungsunterlagen Univ. Prof Dr. Andreas Rizzi, Einführung in die Massenspektrometrie].

3.3.1.5 Tandemmassenspektrometrie

Mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie, auch MS/MS-Spektrometrie genannt, ergibt sich die Möglichkeit einerseits das Auflösungsvermögen zu verbessern und andererseits Fragmentierungen zu studieren. Dieses Prinzip stellt eine enorme Erleichterung bei der Identifizierung von unbekannten Substanzen dar. Man koppelt mehrere Analysatoren hintereinander. Am weitesten verbreitet sind sogenannte Triplequads (QqQ). Bei diesem Prinzip werden im ersten Analysator Pseudomoleküle isoliert und anschließend im zweiten Analysator, der sogenannten Kollisionszelle, jene Moleküle durch Stöße mit einem Inertgas angeregt und letztendlich fragmentiert. Im dritten Quadropol hat man entweder die Möglichkeit alle Produktionen des im ersten Quadropol isolierten Ions zu scannen oder nur ein oder zwei Fragmentationen auszuwählen und diese sehr selektiv zu quantifizieren. Dieses Prinzip nennt man *MRM* (multiple reaction monitoring).

3.3.1.6 Detektoren

Photomultiplier, Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder Faraday-auffänger sind die gängigsten Detektortypen, welche in der Massenspektrometrie Verwendung finden. Der SEV wird teilweise in Kombination mit einer Konversionsdynode verwendet, bei der die Ionen aufgrund einer angelegten hohen Beschleunigungsspannung (bis zu 25 kV) auf eine Metalloberfläche prallen und der SEV schließlich die freiwerdenden Elektronen detektiert.

Weiters werden als Detektor auch Daly-Detektoren, Mikrokanalplatten und Channeltrons verwendet. Am Beginn der Massenspektrometrie wurden auch Fotoplatten benutzt [SKOOG und LEARY, 1992].

4 Material und Methoden

4.1 Reagenzien, Proben und Substanzen

4.1.1 Reagenzien

- Bidestilliertes, membranfiltriertes Wasser
- Acetonitril for HPLC – Gradient Grade, HiPerSolv Chromanorm
- Methanol for HPLC– Gradient Grade, HiPerSolv Chromanorm
- Wasserfreies Methanol Merck SeccoSolv, purity >99,5%
- Natrium, Institut für Organische Chemie, Universität Wien
- Ethanol absolut zur Analyse, AustrAlco (Ö. Alkoholhandels-GmbH)
- Essigsäure 100% p.a., Roth
- Salzsäure rauchend 37% p.a., Merck
- n-Hexan for HPLC > 99,9%, Roth
- Natriumhydroxid Plätzchen p.a., Merck
- Natriumacetat-Trihydrat p.a., Merck
- β -Glucuronidase/Arylsulfatase from *Helix pomatia*, Roche
- Cellulase Onozuka R-10 from *Trichodema viride*, Merck

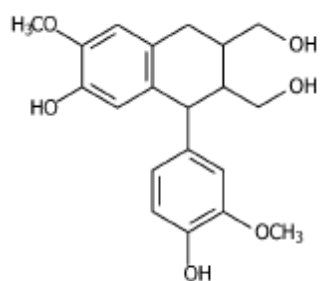
4.1.2 Proben

Leinsaat ganz aus Grimmerstein, Österreich (Bio-Kontrollnummer AT-W01 Bio) wurde in Bioläden in Wien gekauft.

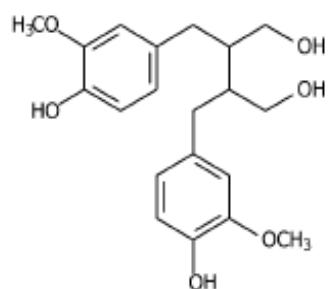
4.1.3 Standardsubstanzen

Lignanname	Herkunft
Isolariciresinol	Separation Research, Turku (Finnland), Reinheit > 95%
Hydroxymatairesinol	Arbonova, Turku (Finnland), Reinheit > 95%
Secoisolariciresinol	Arbonova, Turku (Finnland), Reinheit > 95%
Lariciresinol	Arbonova, Turku (Finnland), Reinheit > 95%
Pinoresinol	Arbonova, Turku (Finnland), Reinheit > 95%
Matairesinol	Arbonova, Turku (Finnland), Reinheit > 95%

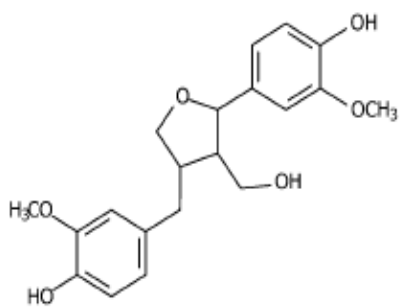
Tabelle 2: Standardsubstanzen



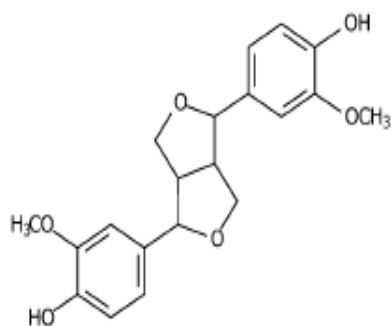
Isolariciresinol
MM = 360.1



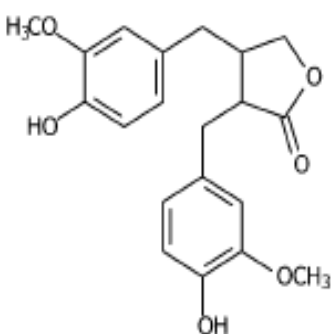
Secoisolariciresinol
MM = 362.1



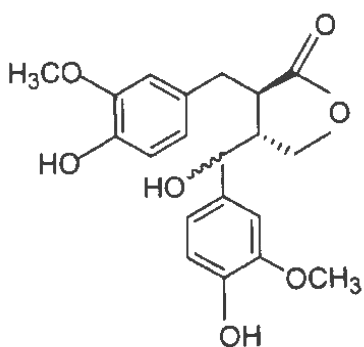
Lariciresinol
MM = 330,1



Pinoresinol
MM = 358,1



Matairesinol
MM = 358,2



Hydroxymatairesinol
MM = 372.1

Abbildung 14: Strukturformeln der Standardsubstanzen

4.1.4 Herstellung der Standardlösungen

Es wurde jeweils ein Urstandard mit einer Konzentration von etwa 200 mg/L von den vorher genannten sechs Substanzen hergestellt (siehe Tab. 4). Dazu wurden etwa 2 mg der festen Reinsubstanzen auf einer Analysenwaage eingewogen, anschließend in einen 10 mL Messkolben transferiert und mit Ethanol absolut bis zur Marke aufgefüllt. Zur Herstellung der Lignanstandardmischung wurden 2 mL von Pinoresinol und jeweils 1 mL von den anderen Urstandards entnommen und in einen 10 mL Messkolben überführt. Anschließend wurde Ethanol mit Stickstoff abgeblasen und mit Acetonitril/Wasser (20:80, v:v) bis zur Marke aufgefüllt. Die erhaltene Konzentration jeder einzelnen Substanz dieser Mischung betrug etwa 20 mg/L und für Pinoresinol etwa 40 mg/L (siehe Tab. 5).

Ausgehend von dieser Standardmischung wurde je nach Gebrauch weiter mit Acetonitril/Wasser (20:80, v:v) verdünnt.

4.1.5 Geräte

4.1.5.1 HPLC-UV-MS

Die Trennung erfolgte mit einem Agilent 1100 series HPLC-System (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Es setzte sich zusammen aus einem G1322A mobile Phase Vakuum Entgaser, einer G1312A binären Pumpe, einem G1313A Autosampler zur Probenaufgabe und einem VDW-G1314A UV Detektor mit variabler Wellenlänge. Gekoppelt wurde das HPLC-Gerät mit einem HCT-plus Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Die Ionisierung erfolgte über Elektrospray Ionisation (ESI) und die Stickstoffversorgung über Dominick Hunter – Nitrox – UHPLCMS 18 Kartuschen.

Ausgewertet wurden die Daten und Chromatogramme mit dem HyStar 3.1 Software Programm namens Data Analysis Version 3.3 von Bruker Daltonics.

Detektiert wurden Lignane im UV bei 280 nm und ESI-MS im negativen Modus sowohl über den scannenden Betrieb (100-1000 m/z, qualitative Analyse) als auch über den MRM-Modus (100-450 m/z, Isolierung des deprotonierten

Molekülion $[M - H]^-$ im Falle von ISO, HMR, SECO, MAT, PINO; Fragmentierung des deprotonierten Molekülions ohne vorherige Isolierung und anschließender Isolierung des Fragmentions $[M - H - 30]^-$ im Falle von LAR, quantitative Analyse). Die optimalen MS Einstellungen (Kapillarspannung: +2.5 kV, Druck des Zerstäubers: 40 psi, Gasflussrate: 10 L/min, Gastemperatur: 300 °C, Skimmer Potential: 50 V, Kapillarausgangspotential: 200 V, Trap Drive: 37) wurden über das Software-Programm ermittelt und kontrolliert.

4.1.5.1.1 Stationäre Phase

Als stationäre Phase wurde eine ACE 3 C18-Säule (100 x 2.1 mm, Porengröße: 3 μ m), ausgestattet mit einer Vorsäule bestehend aus demselben Material wie die Hauptsäule (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Schottland), in die HPLC-Apparatur eingesetzt.

4.1.5.1.2 Mobile Phase

Die mobile Phase A war 0,1% Essigsäure in Wasser und die mobile Phase B bestand aus 0,1% Essigsäure in Acetonitril (ACN). Es wurde ein Gradientenprogramm entwickelt, welches sich wie folgt zusammensetzte: 0-0.5 min: 10% B; 0.5-12 min: linearer Anstieg bis zu 30% B; 12-20 min: linearer Anstieg bis zu 60% B; 20-21 min: Abfall zu 10% B; 21-30 min: Re-equilibration.

4.1.5.2 Allgemeine Laborausrüstung

Analysenwaage:	Mettler AT 400
Mikrowaage:	Sartorius Mikro M 3P
Küchenzerkleinerer:	Krups Speedy Pro
Pipetten:	Gilson 100 μ l, 1000 μ l
Ultraschallbad:	Bandelin Sonorex Super RK 103H Isobad GmbH Heidelberg Pilz G2/100ml
pH-Meter:	Metrohm 691
Zentrifugen:	Hettich Universal
SPE-Apparatur:	Machery-Nagel
Vakuum-Pumpe:	KNF Neuberger Laboport

Rotavapor:	BÜCHI Rotavapor E120
Schüttler:	MTS4, IKA-Labortechnik
Extraktionshülsen:	Machery-Nagel Extraktionshülsen MN 645
Membranfilter:	Sartorius PTFE-Filter 0.45 µm
SPE-cartridges:	AccoBondHISPE ODS-C18 cartridges (500 mg, 3 ml)
Injektionsspritzen:	B/Braun Inject 2 ml
Spritzenfilter:	4 mm HPLC Syringe Filters, PTFE, 0.45 µm
Pasteurpipetten	

4.1.6 Methoden

4.1.6.1 Qualitative und quantitative Analyse

5, 10 oder 20 μL der Standardlösungen oder 10 μL der verdünnten Probenextrakte wurden injiziert, die Substanzen getrennt und mit UV- oder ESI-MS detektiert. Die Lignanaglycone wurden identifiziert indem die Retentionszeiten und die Massenspektren mit jenen der Standardsubstanzen verglichen wurden. Für die qualitative Analyse wurde im Scan-Modus (100-1000 m/z) gemessen und für die quantitative Analyse im Isolierungs- und Fragmentierungs-Modus (siehe Tab. 3). Es wurden bereits in Vorversuchen getestete Optimalbedingungen zur Auftrennung und Detektion von Lignanen übernommen.

Substanz	negativer MRM Modus		
	MS 2		MS 3
Isolariciresinol	Isol. von 359.1		
Hydroxymatairesinol	Isol. von 359.1		
Secoisolariciresinol	Isol. von 361.1		
Lariciresinol		Frag. von 97	Frag. von 329.1
Pinoresinol	Isol. von 357.1		
Matairesinol	Isol. von 357.1		

Tabelle 3: MRM-Einstellungen im Isolierungs- und Fragmentierungsmodus;

4.1.6.1.1 Kalibration

Es wurden aus den Lignanen Isolariciresinol, Secoisolariciresinol, Lariciresinol und Pinoresinol Urstandards hergestellt, anschließend 1:10 mit Acetonitril/Wasser (20:80; v:v) verdünnt (siehe Tab. 5) und zu einem Standardgemisch vereinigt. Zur Ermittlung der Kalibrierfunktionen wurden die Lignanstandardmischungen mit Konzentrationen von 0.002; 0.02; 0.2; 2; 20 mg/L zu je 5, 10 und 20 μL injiziert. Für Pinoresinol wurde die doppelte

Konzentration im Standardgemisch genommen, da es schlechter detektierbar war und die Nachweisgrenze im Bereich von 0,2 mg/L lag. Der untersuchte Konzentrationsbereich lag zwischen 0.001 – 40 mg/L. Darüber hinaus wurde eine Kalibrierfunktion erstellt, wobei die Konzentrationen gegen die Signalfächen aufgetragen wurden.

Abkürzung	Lignanstandards	Konzentration (mg/L)
ISO	Isolariciresinol	235,0
SECO	Secoisolariciresinol	206,5
LARI	Lariciresinol	193,7
PINO	Pinoresinol	202,0

Tabelle 4: Konzentrationen der Urstandards

Abkürzung	Lignanstandards	Konzentration (mg/L)
ISO	Isolariciresinol	23,50
SECO	Secoisolariciresinol	20,65
LARI	Lariciresinol	19,37
PINO	Pinoresinol	40,40

Tabelle 5: Konzentrationen der Urstandards im Gemisch 1:10 verdünnt

4.1.6.1.2 Nachweisgrenzen (LOD – Limit of detection)

Es wurden Verdünnungen von einem Standardgemisch im Konzentrationsbereich von 0.002 und 0.2 mg/L hergestellt und injiziert (5, 10 und 20 µL). In einem ausgewählten Chromatogramm wurde der Wert des Rauschens vom höchsten zum tiefsten Punkt bestimmt und anschließend mit 3 multipliziert. Dieser Wert wurde in die Kalibrierfunktion eingesetzt und der entsprechende Wert abgelesen.

4.1.6.1.3 Erfassungsgrenze (LOQ - Limit of quantitation)

Abermals wurden Verdünnungen der Standardlösungen zwischen 0.002 und 0.2 mg/L hergestellt, injiziert (5, 10 und 20 µL) und vermessen. Das maximale Rauschen wurde ermittelt und mit 10 multipliziert (S/N=10) und dieser Wert in

die entsprechenden Eichfunktionen eingesetzt. Die so erhaltenen Konzentrationen ($\pm 5\%$) entsprechen dem "Limit of quantitation".

4.1.6.1.4 LOD und LOQ der Proben

Je 10 μL des verdünnten Probenextraktes wurden injiziert und aus den Chromatogrammen die Mittelwerte der Rauschsignale ermittelt. Die Werte wurden mit 3 (LOD) oder mit 10 (LOQ) multipliziert und anschließend in die Eichfunktionen eingesetzt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 9 zusammengefasst.

4.1.6.2 Reproduzierbarkeit

Zur Beschreibung der Reproduzierbarkeit der Analysenmethode wurden „Intra- und Interday“ Reproduzierbarkeit durch Messungen an Standardlösungen durchgeführt.

4.1.6.2.1 Intraday-Reproduzierbarkeit

Bei der Ermittlung der Intraday-Reproduzierbarkeit wurde ein Gemisch von vier Standardsubstanzen in einer Konzentration von 0.2 mg/L an einem Tag fünfmal hintereinander in die HPLC Apparatur injiziert (10 μL) und mit ESI-MS vermessen. Anschließend wurden die Signalfächen in die Eichfunktionen der Einzelsubstanzen eingesetzt und der Messwert sowie die relative Standardabweichung (RSD %) ermittelt.

4.1.6.2.2 Interday-Reproduzierbarkeit

Das Standardgemisch (10 μL) mit gleicher Zusammensetzung und Konzentration (0.2 mg/L) wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen dreimal pro Tag injiziert. Ausgewertet wurde wie in Abschnitt 4.1.6.2.1 beschrieben.

4.1.6.3 Analyse von Lignan

Abhängig von der Pflanze können Lignane als freie Aglycone, glykosidisch gebunden, verestert oder als strukturelle Untereinheiten von Biooligomeren vorliegen. Die Auswahl der Analysenmethode hängt von der Struktur der Lignane in den bestimmten Lebensmitteln ab.

4.1.6.3.1 Probenbereitstellung

Leinsamenproben (ungeschrotet) zwischen 500-1000 g wurden in Supermärkten und Bioläden in Wien, Österreich in einem Zeitraum von Herbst 2007 bis Frühjahr 2008 gekauft.

4.1.6.3.2 Probenbehandlung

Eine Probenmenge von jeweils 20-30 g wurde an der Universität für Bodenkultur, Wien, Abt. Lebensmitteltechnologie in einem Industriebrotbackofen (der Type 60/3 W, Manz Backtechnik GmbH, Münster Deutschland) geröstet. Die Rösttemperaturen betrugen 100°C, 150°C, 200°C und 250°C. Bei jeder Temperaturstufe wurde die Probe für 10 und 20 Minuten geröstet, ausgenommen bei 250°C. Aufgrund der enormen Hitze platzten die Leinsamenkörner auf und wurden demnach nach 3,5 Minuten aus dem Ofen genommen. Der Gewichtsverlust beim Röstprozess durch Wasserverdampfung wurde durch Wägen vor und nach dem Rösten bestimmt. Anschließend wurden sowohl die gerösteten als auch die ungerösteten Leinsamenproben in einem kommerziellen Küchenmixer zu einem gleichmäßigen Schrot zerkleinert und einer Entfettung über eine Soxhlet-Extraktion unterzogen.

Hierfür wurden jeweils 20 g Aliquote in eine Extraktionshülse eingewogen und mit 200-250 mL n-Hexan für 6-8 Stunden entfettet. Der fettfreie Schrot wurde mittels einem Rotavapor getrocknet und darüber hinaus bei -18°C, unter Lichtausschluss, tiefgefroren.

4.1.6.3.3 Extraktion

Verschiedene Extraktions- und Hydrolysemethoden wurden getestet, um Leinsamen zu analysieren. Die entnommene Probenmenge für die Analyse betrug etwa 500 mg. Jede Probe wurde mindestens im Doppelansatz aufgearbeitet.

Unter drei verschiedenen Bedingungen wurde extrahiert und die erhaltenen Werte miteinander verglichen: a) Extraktion mit Ethanol/Wasser (70:30; v:v) im Ultraschallbad; b) Extraktion unter alkalischen Bedingungen mit

Natriumhydroxid; c) Extraktion unter alkalischen Bedingungen mit wasserfreiem Natriummethoxid;

Nach der Extraktion wurden die Probelösungen in Eppendorf Röhrchen transferiert und der Rückstand im Extraktionsgefäß 2mal mit dem jeweiligen Lösungsmittel nachgespült.

Anschließend wurden die Lösungen bei 10.000 rpm für 10-15 min zentrifugiert und darauf folgend entweder direkt bzw. verdünnt in das HPLC-Messgerät injiziert (10 µL) oder einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen.

Extraktion mit Ethanol/Wasser im Ultraschallbad:

Jeweils 500 mg Probe wurde mit 10 mL einer Lösung aus Ethanol/Natriumacetat Puffer (70:30, v:v; 0.1 M, pH 5 eingestellt mit Essigsäure) versetzt und anschließend bei 60°C für 2 Stunden im Ultraschallbad behandelt. Dann wurde gewartet, bis die Extraktionslösung auf Raumtemperatur abgekühlt war. Die Probe wurde von den oben für die Extraktion geeigneten autoklavierbaren Glasröhrchen in Eppendorf Röhrchen transferiert und für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die flüssige Phase konnte abgezogen werden und der feste Rückstand wurde mit 5 mL Ethanol/Wasser (70:30, v:v) gewaschen und noch einmal für 10 min zentrifugiert. Die flüssigen Phasen wurden vereinigt, in einen Spitzkolben gegeben und auf etwa 2 mL am Rotationsverdampfer abgedampft. Der Kolben wurde mit 2 mL Acetonitril ausgespült, die Probenlösung in einen 10 mL Messkolben transferiert und bis zur Marke mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Extraktion unter alkalischen Bedingungen im Ultraschallbad:

Jeweils 500 mg Probe wurden mit 10 mL einer Lösung aus Methanol/Wasser (70:30, v:v) versetzt, dazu wurde festes NaOH addiert und auf eine Konzentration von 0.3 M gebracht. Anschließend wurde die Probe für eine Stunde bei 60°C im Ultraschallbad behandelt. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde ein pH-Wert zwischen 5 – 6 mit ca. 300 µL Essigsäure eingestellt. Darüber hinaus wurde die Probe bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert und die flüssige Phase abgezogen. Der Rückstand

wurde mit 5 mL Methanol/Wasser (70:30, v:v) gewaschen und abermals zentrifugiert. Weiters wurden die flüssigen Phasen vereinigt, in einen Spitzkolben transferiert und auf ca. 2 mL im Rotavapor eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 mL Acetonitril gelöst, in einen 10 mL Messkolben überführt und bis zur Marke mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

Extraktion mit wasserfreiem Natriummethoxid im Ultraschallbad:

250 mg Probe wurde eingewogen und mit 5 mL einer Lösung aus wasserfreiem Natriummethoxid (200 mg metallisches Natrium wurden in 50 mL wasserfreiem Methanol gelöst) versetzt und für 3 Stunden bei 40°C im Ultraschallbad behandelt. Das Wasser des Ultraschallbades wurde halbstündlich gewechselt, um eine zu starke Erwärmung zu vermeiden. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, ist ein pH-Wert zwischen 5-6 mit Essigsäure eingestellt worden. Anschließend wurden wieder 2 mL Natriumacetat Puffer (0.1 M, pH 5) zugegeben und die Probe wurde abermals für ca. 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach Abkühlung der Probe auf Raumtemperatur wurde diese bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde abgetrennt und in einen 10 mL Messkolben transferiert und der Rückstand wurde mit 2.5 mL Methanol/Wasser (50:50; v:v) gewaschen. Nach weiteren 10 min Zentrifugation wurden die flüssigen Phasen vereinigt und der Messkolben bis zur Marke mit Methanol/Wasser (50:50; v:v) aufgefüllt.

4.1.6.3.4 Enzymatische Hydrolyse

1 mL von jedem Extrakt, welcher mit den oben angeführten Extraktionsmethoden erhalten wurde, wurde mit 3,5 mL Natriumacetat Puffer (0.1 M, pH 5) versetzt. Anschließend wurden 40 µL *Helix pomatia* juice und 20 mg Cellulase zugegeben und die Lösung wurde bei 37°C für 20 Stunden in einem Wasserbad unter Rühren inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Hydrolysat in einem 5 mL Messkolben transferiert und mit Acetonitril bis zur Marke aufgefüllt. Aliquote der erhaltenen Lösung wurden bei 10.000 rpm für 15 min zentrifugiert und weiter verdünnt. Sie standen für die Analyse mittels HPLC-UV-MS zur Verfügung.

4.1.6.3.5 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse

Es wurde ein Vergleich zwischen der Enzymwirksamkeit von Cellulase und Helix pomatia juice aufgestellt. Dazu wurde von der alkalischen Extraktion jeweils 3x1 mL Probe (im Doppelansatz) entnommen und entweder mit 40 µL Helix pomatia juice, 20 mg Cellulase oder mit jeweils den gleichen Ansätzen beider Enzyme versetzt und anschließend die gleiche Prozedur wie in Abschnitt 4.1.6.3.4 beschrieben, durchgeführt.

4.1.6.3.6 Bewertung der durchgeführten analytischen Methoden

Um die Wiederfindung der einzelnen im Leinsamen gefundenen Lignane zu ermitteln, wurde die Standardadditionsmethode eingesetzt. Hierfür wurden die einzelnen Lignane, abhängig von deren vorher festgestellten Konzentrationen, addiert. Die Ausbeuten wurden aus dem Verhältnis der Geradenanstiege der Standardadditionsmethode und der externen Kalibriergeraden erhalten. Anschließend wurden diese Werte mit 100 multipliziert.

$$y = kx + d$$

$$\text{Ausbeute(\%)} = \frac{k_1}{k_2} \times 100$$

k_1 Anstieg der Standardadditionsgeraden

k_2 Anstieg der Kalibrationsgerade

Die Probenaufarbeitung erfolgte durch a) Extraktion unter alkalischen Bedingungen (siehe 4.1.6.3.3).

5 Ergebnisse und Diskussion

Vorerst musste eine HPLC-ESI-MS Methode entwickelt werden, mit der die zu erwartenden Lignane bestimmt werden konnten.

5.1 Trennung und Detektion eines Standardgemisches

Ein Standardgemisch, welches 6 Lignane enthielt, wurde injiziert. Die Trennung erfolgte mittels Gradientenelution über Reversed-Phase HPLC, gekoppelt mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer. Die mobile Phase A setzte sich aus 0,1% Essigsäure in Wasser zusammen, die mobile Phase B bestand aus 0,1% Essigsäure in Acetonitril. Detektiert wurden die Lignane mittels ESI-MS im negativen Modus über den scannenden Betrieb und über den MRM-Modus (Abb. 15).

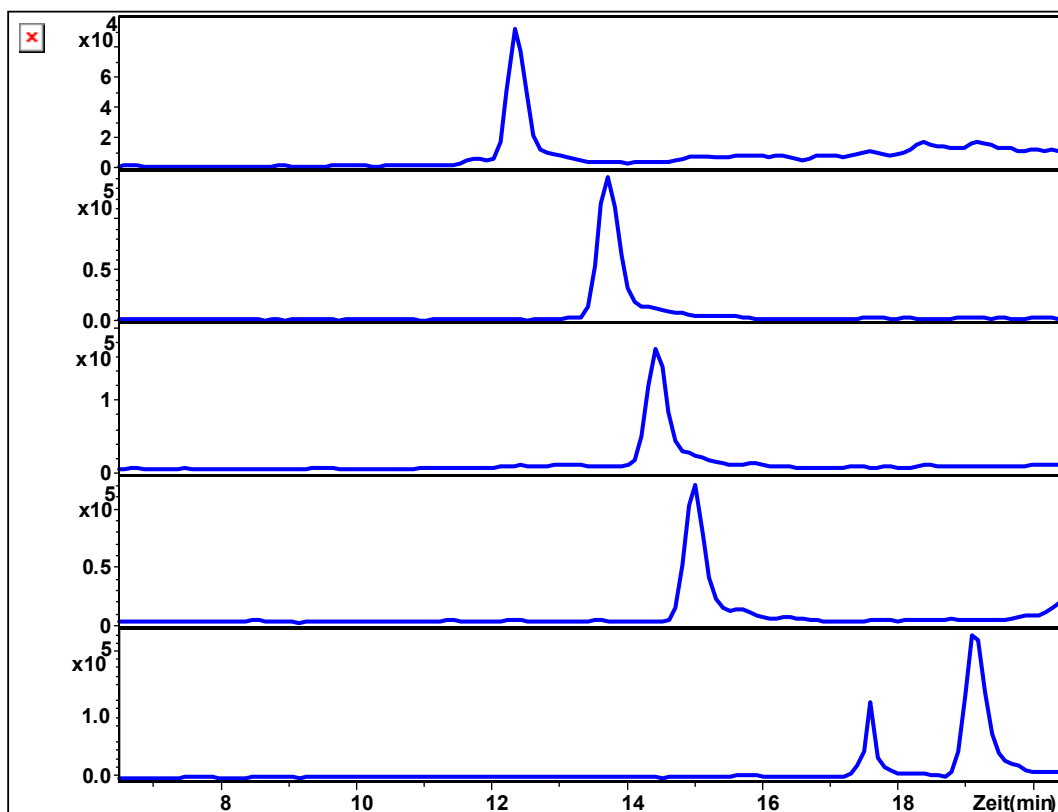


Abbildung 15: ESI-MS-Chromatogramm des Standardgemisches

Aufgrund eines Vorversuches, in dem im Leinsamen nur ISO, SECO, LARI und PINO identifiziert werden konnten, wurden alle weiteren Versuche mit diesen Substanzen durchgeführt.

5.2 Erstellen von Kalibrierfunktionen

5.2.1 Linearer Bereich

Die Chromatogramme der Standardlösungen wurden ausgewertet und die Peakflächen gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen (siehe Abb. 16-19). Im untersuchten Konzentrationsbereich von 0.01 – 2 mg/L wurde für ISO, SECO und LARI ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration festgestellt. Für PINO lag der lineare Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration im Bereich von 0.02 – 4 mg/L.

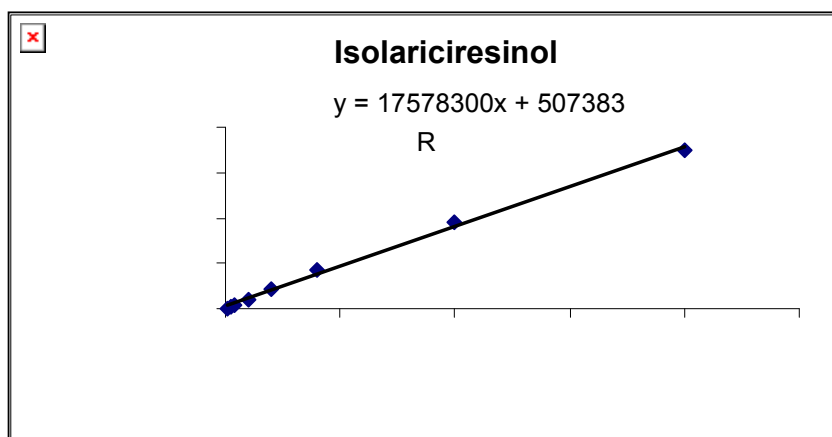


Abbildung 16: Kalibriergerade für Isolariciresinol (m/z = 359.1)

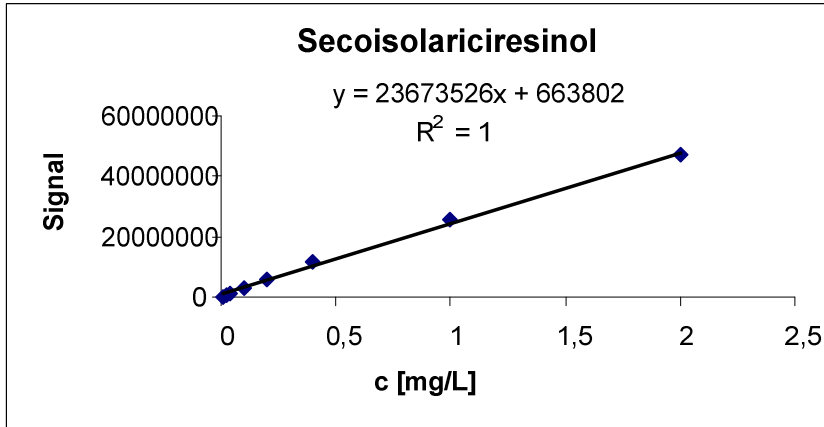


Abbildung 17: Kalibriergerade für Secoisolariciresinol ($m/z = 361.1$)

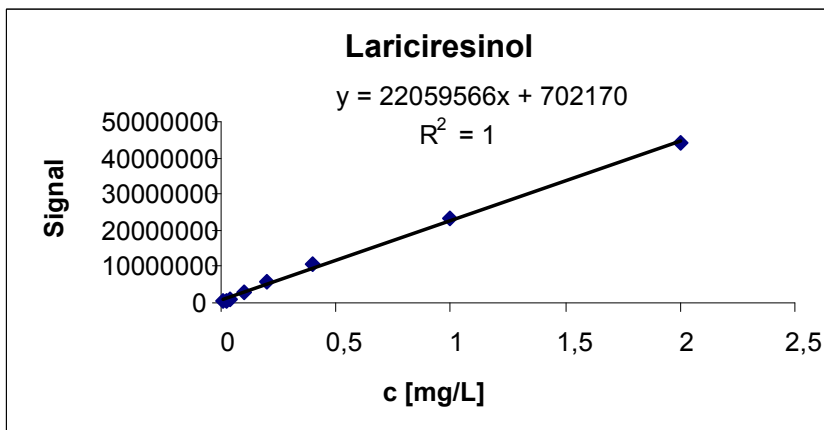


Abbildung 18: Kalibriergerade für Lariciresinol ($m/z = 329.1$)

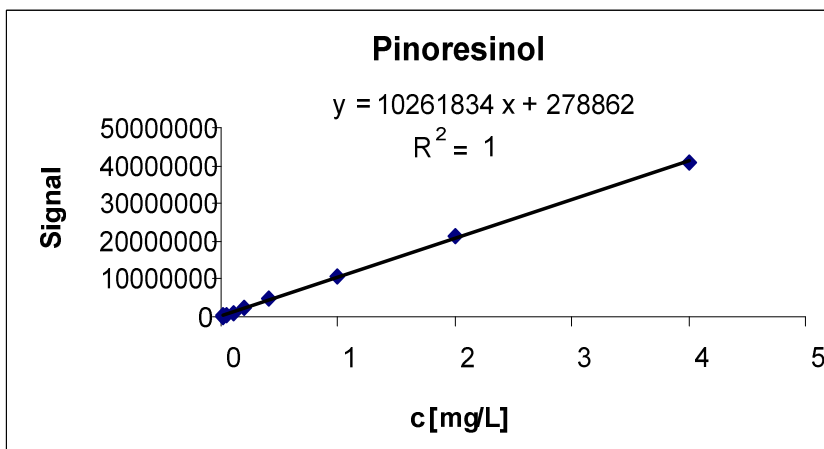


Abbildung 19: Kalibriergerade für Pinoresinol ($m/z = 357.1$)

Um Messwertfehler auszuschalten, wurden die Eichfunktionen aufgrund von Schwankungen des Messgerätes wiederholt aufgenommen.

5.2.2 Nachweisgrenze (LOD – Limit of detection)

Die Nachweisgrenzen für ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3 der einzelnen Lignanstandards wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen bestimmt. Tab. 6 zeigt die dabei erhaltenen Werte.

Nachweisgrenzen (LOD)	
Lignane	Konzentration (mg/L)
ISO	0,006
SECO	0,005
LARI	0,005
PINO	0,010

Tabelle 6: Nachweisgrenzen (LOD) der Lignane

5.2.3 Erfassungsgrenze (LOQ – Limit of quantitation)

Die Erfassungsgrenzen ($S/N = 10$) der Standardsubstanzen wurden mit den analogen Verdünnungsreihen wie in Abschnitt 5.2.2 bestimmt. Hier wurde nach Einsetzen der gemessenen Werte in die Kalibrierfunktion eine Abweichung von $\pm 5\%$ berücksichtigt.

Erfassungsgrenze (LOQ)	
Lignane	Konzentration (mg/L)
ISO	0,024
SECO	0,010
LARI	0,010
PINO	0,020

Tabelle 7: Erfassungsgrenzen (LOQ) der Lignane

5.2.4 LOD und LOQ der Probe

Von praktischem Interesse waren die Nachweisgrenzen und die Erfassungsgrenzen der Lignane in der Probe. Da verschiedene Aufarbeitungsmethoden angewandt wurden, wurden für jede dieser Methoden beide Parameter bestimmt und miteinander verglichen.

Aufarbeitungsmethode	Lignane	LOD (mg/100 g)	LOQ (mg/100 g)
Extraktion mit Ethanol/Wasser + enzymatische Hydrolyse	ISO	n.d	n.d
	SECO	0,46	1,40
	LARI	1,00	3,02
	PINO	5,47	17,60
Extraktion mit Natronlauge + enzymatisch Hydrolyse	ISO	0,60	1,87
	SECO	0,73	2,10
	LARI	0,48	1,92
	PINO	3,70	12,15
Extraktion mit wasserfreiem Natriummethoxid + enzymatisch Hydrolyse	ISO	1,35	4,06
	SECO	1,07	2,92
	LARI	0,81	3,14
	PINO	5,46	17,60

Tabelle 8: Nachweisgrenzen und Erfassungsgrenzen der Proben (n.d. = nicht detektierbar)

Die unterschiedlichen Nachweisgrenzen für die einzelnen Verbindungen sind auf ihr unterschiedliches Elutionsverhalten und auf die unterschiedliche Empfindlichkeit, mit der die Verbindungen angezeigt werden, sowie auf das höhere Rauschen verursacht durch die Probenmatrix zurückzuführen.

5.3 Reproduzierbarkeit

5.3.1 Intraday Reproduzierbarkeit gemessen in Standardlösungen

Das Gemisch von 4 Standardsubstanzen mit einer Konzentration von 0.2 mg/L (PINO 0.4 mg/L) wurde fünf Mal hintereinander an einem Tag in die LC-MS-Apparatur injiziert (10 µL) und die Chromatogramme wurden über die Peakflächen ausgewertet. Die höchste relative Standardabweichung liegt bei 3,9% (siehe Tab. 9)

INTRADAY-REPRODUZIERBARKEIT			
Lignanstandard	Mittelwert	Stabw.	rel. Stabw. (%)
ISO	0,22	0,003	1,58
SECO	0,17	0,004	2,50
LARI	0,20	0,005	2,77
PINO	0,37	0,015	3,90

Tabelle 9: Intraday-Reproduzierbarkeit von Standardsubstanzen durch Messungen der Peakflächen

5.3.2 Interday-Reproduzierbarkeit gemessen in Standardlösungen

Das unter 5.3.1 angeführte Gemisch der vier Standardsubstanzen wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 3 Mal täglich injiziert (10 µL) und die Chromatogramme ausgewertet. Die relativen Standardabweichungen der Messwerte bewegten sich zwischen 5,51% und 11,59%. Deshalb wurden für jede Messserie neue Kalibrierfunktionen erstellt, um eine erfolgreiche Quantifizierung sicherzustellen.

INTERDAY-REPRODUZIERBARKEIT			
Lignanstandard	Mittelwert	Stabw.	rel. Stabw. (%)
ISO	0,21	0,021	9,79
SECO	0,17	0,014	8,30
LARI	0,20	0,011	5,51
PINO	0,43	0,050	11,59

Tabelle 10: Interday-Reproduzierbarkeit von Standardsubstanzen durch Messungen der Peakflächen

5.4 Analyse von Lignanen

5.4.1 Behandlung der Proben

Für die Untersuchungen wurde gerösteter und ungerösteter Leinsamen eingesetzt. Dazu wurden die Samen in einem Backofen geröstet und anschließend entfettet und zerkleinert. Die Röstbedingungen wurden so gewählt, wie sie beim Backprozess zu erwarten sind. Hierbei beträgt die Temperatur im Brot nicht mehr als 100°C und die Temperatur außen auf der Kruste kann bis zu 250°C ansteigen (siehe Tab. 12). Weiters wurde die Gewichtsabnahme der Leinsamenkörner infolge des Wasserverlustes durch Wägen der Proben vor und nach dem Rösten bestimmt. Dieser lag zwischen 2,6 und 3,4 %. Die gerösteten und ungerösteten Leinsamenkörner wurden darüber hinaus mit n-Hexan in einer Soxhlet-Apparatur behandelt, um die Fette zu entfernen. Wie Tab. 13 zeigt liegt der Fettgehalt zwischen 36,7 und 38,2 %.

RÖSTBEDINGUNGEN	
Rösttemperatur (°C)	Röstdauer (min)
250	3,5
200	20
	10
150	20
	10
100	20
	10

Tabelle 11: Angaben über die Röstbedingungen

FETTBESTIMMUNG im Leinsamen			
1. Entfettung mit 250 mL n-Hexan für 6 Stunden			
Einwaage Probe (g)	Gewicht des Kolben (g)	Gewicht nach der Entfettung + Kolben (g)	Fettgehalt in %
20,11	60,44	72,87	38,19
2. Entfettung mit 200 mL n-Hexan für 8 Stunden			
15,07	60,44	69,98	36,72

Tabelle 12: Fettgehalt in % im ungeschroteten Leinsamen

5.4.2 Qualitative Analyse

Um festzustellen, welche Lignane generell im Leinsamen nachweisbar sind, wurden die Chromatogramme eines Standardgemisches mit 6 Lignanen anhand der Retentionszeiten mit jenen der Probe verglichen.

RETENTIONSZEITEN (min)				
Lignanstandard	m/z	Standardlösungen	NaOMe-Ex. +enzym. Hydrolyse	NaOH-Ex. +enzym. Hydrolyse
ISO	359.1	12,3	12,3	12,3
HMR	373.1	13,7	n.d.	n.d.
SECO	361.1	14,4	14,4	14,4
LARI	329.1	15,0	15,0	15,0
PINO	357.1	17,6	17,6	17,6
MAT	357.1	19,1	n.d.	n.d.

Tabelle 13: Vergleich der Retentionszeiten der Standardlösungen mit jenen der Probe nach alkalisch-enzymatischer Hydrolyse (n.d. = nicht detektierbar)

Wie bereits vorher erwähnt, konnten im Fall von Leinsamen nur ISO, SECO, LARI und PINO identifiziert werden. Deshalb kam bei allen weiteren Tests nur noch ein Standardgemisch bestehend aus diesen vier Lignanen zum Einsatz. Auch die Tests auf Nachweisgrenzen und Reproduzierbarkeit wurden nur mit dem Standardgemisch, welches die identifizierten Lignane enthielt, durchgeführt.

5.4.3 Quantitative Analyse

5.4.3.1 Ermittlung der optimalen Aufarbeitungsmethode

In diesem Teil der Arbeit ging es in erster Linie darum, durch die Aufarbeitungsmethode herauszufinden, in welcher Form (verestert, glycosidisch gebunden oder als freie Aglycone) die Lignane im Leinsamen vorliegen und die Methode, welche die höchsten Ausbeuten liefert, zu finden. Mit dieser sollten dann schließlich die Wiederfindung und der Gehalt an Lignanen im Leinsamen bestimmt werden. Im Anschluss daran wurde untersucht, ob die Lignane durch Röstvorgänge verändert werden und ob diese Veränderungen eine Änderung der Probenaufarbeitung erforderlich machen. Die Proben wurden mindestens im Dreifachansatz analysiert und anschließend der Mittelwert daraus berechnet.

5.4.3.1.1 Extraktion mit Ethanol/Wasser im Ultraschallbad

Durch diese Aufarbeitungsmethode sollte sich der Gehalt an freien Aglyconen sowie das Peakmuster der veresterten und nicht veresterten Lignanglycoside bestimmen lassen. Es ergaben sich jedoch keinerlei Hinweise, dass im Leinsamen freie Aglycone vorliegen. Veranschaulicht werden diese Ergebnisse anhand Abb. 20.

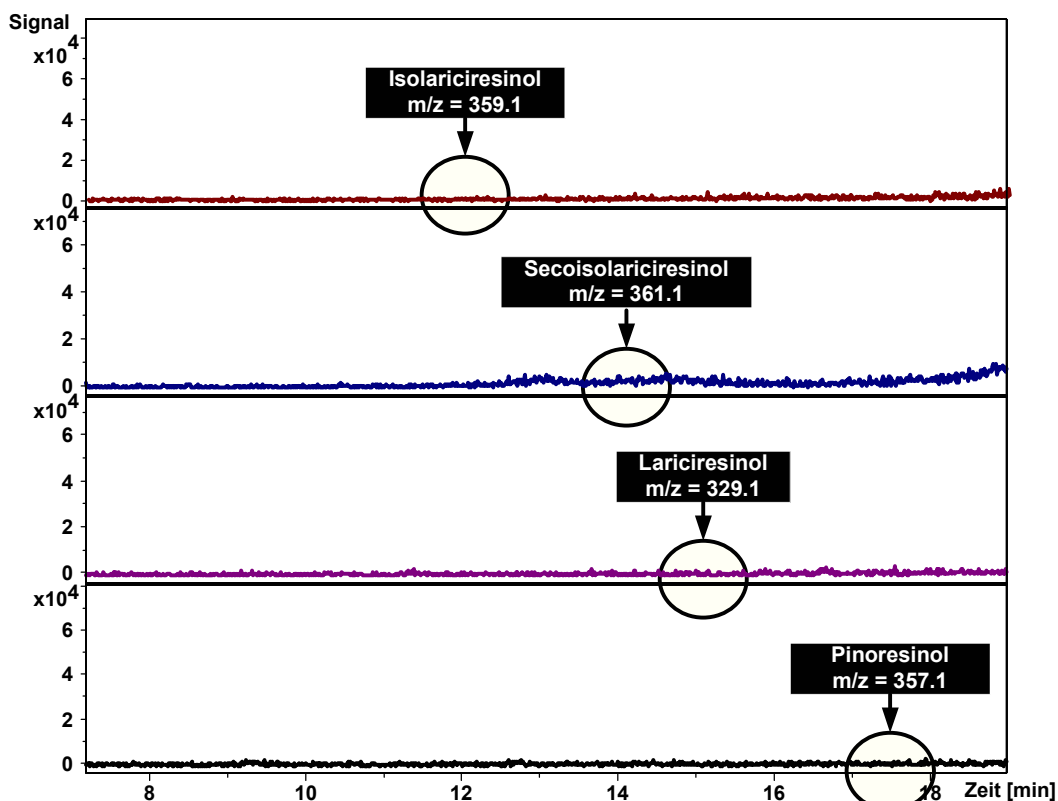


Abbildung 20: ESI-MS-Chromatogramm eines unverdünnten Ethanol/Wasser Extraktes von Leinsamen

5.4.3.1.2 Extraktion mit Ethanol/Wasser im Ultraschallbad und anschließender enzymatischer Hydrolyse

Mit Hilfe dieser Aufarbeitungsmethode sollte man den Gehalt an freien Aglyconen und nicht veresterten glycosidisch gebundenen Lignanen bestimmen können. Wie in Abb. 21 illustriert, konnten Pinoresinol, Secoisolariciresinol und Lariciresinol identifiziert werden.

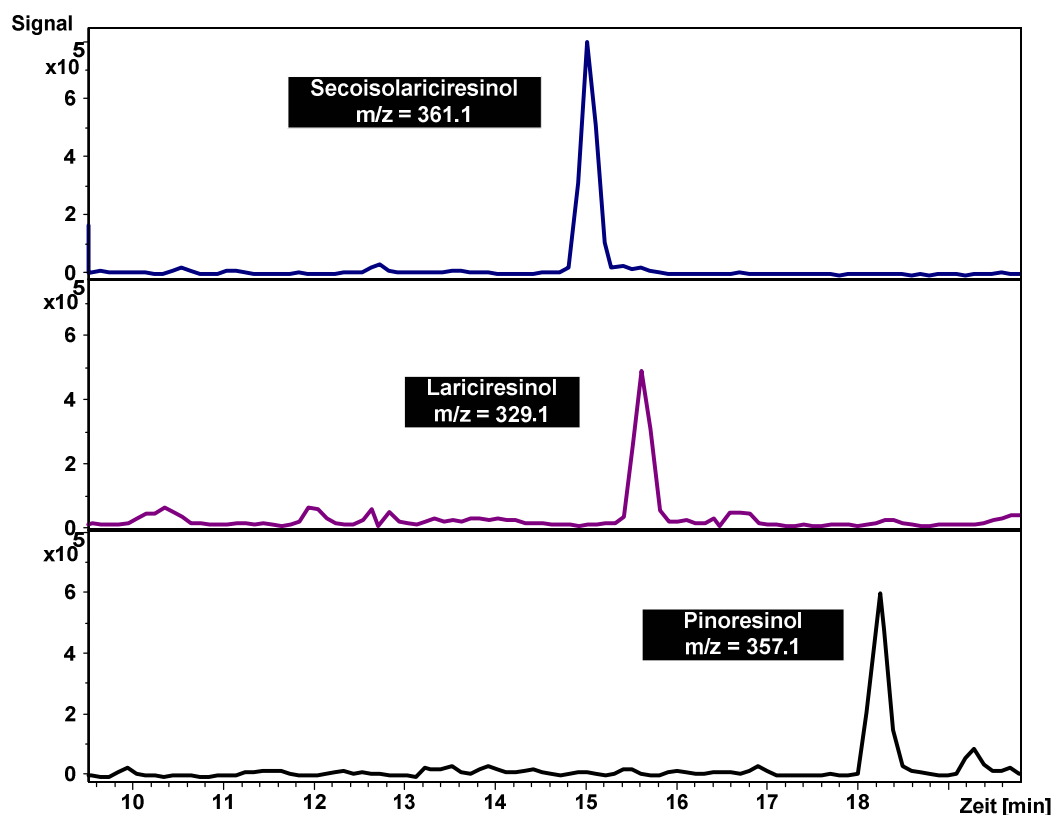


Abbildung 21: ESI-MS-Chromatogramm eines unverdünnten Ethanol/Wasser Extraktes von Leinsamen und anschließender enzymatischer Hydrolyse

Die Analyse der Extrakte nach einer Extraktion mit Ethanol/Wasser und anschließender enzymatischen Hydrolyse beweisen, dass keine freien Aglycone im Leinsamen vorliegen, sondern die Lignane aus ihrer glycosidischen Bindung durch die enzymatische Behandlung freigesetzt wurden und damit die entsprechenden Aglycone gefunden werden konnten. Veresterte Lignane konnten nicht erfasst werden.

Die quantitativen Analysen, die mit Hilfe von Eichfunktionen ohne Berücksichtigung der Wiederfindung ermittelt wurden, sind in Tab. 15 dargestellt. Auffallend war, dass nur sehr geringe Konzentrationen an SECO, LARI und PINO gefunden wurden, was darauf schließen lässt, dass der Großteil der Lignane im Leinsamen sowohl verestert als auch glycosidisch gebunden vorliegt. Berücksichtigt man die oben erwähnten Ergebnisse, so ergibt sich, dass die Extraktion mit Ethanol/Wasser mit anschließender enzymatischen Hydrolyse nicht als optimale Aufarbeitungsmethode gesehen werden kann, da nur freie Aglycone und glycosidisch gebundene Lignane erfasst werden können.

Lignane	Kalibrationsfunktion	Korrelationskoeffizient R ²
SECO	$y = 19783368 x + 694393$	0,998
LARI	$y = 20129162 x + 532318$	0,999
PINO	$y = 5011803 x - 75551$	0,998

Tabelle 14: Eichfunktionen von SECO, LARI und PINO

Weiters wurde der Einfluss des Röstens, sprich einer Hitzebehandlung, auf die Lignanstabilität ermittelt. Anhand der Ergebnisse, die graphisch in den Abb. 22, 23 und 24 dargestellt sind, wird deutlich, dass der Gehalt der einzelnen Lignane in den gerösteten Proben deutlich höher liegt als bei den ungerösteten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass während des Röstprozesses durch die Hitzeeinwirkung schon eine Spaltung in den Aleuronschichten der Samen stattfindet und anschließend die Lignane durch diese „Vorbehandlung“ besser extrahierbar sind.

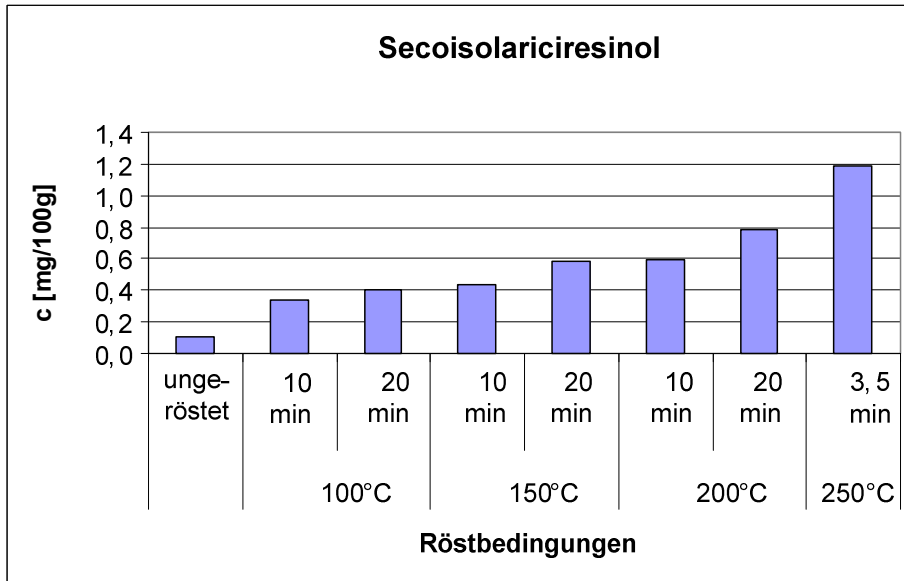


Abbildung 22: Freisetzung von SECO beim Rösten

Im Fall von SECO steigt die freigesetzte Menge mit zunehmender Röstdauer. Bereits bei der niedrigsten Rösttemperatur ist der Gehalt an SECO mehr als doppelt so hoch als in der ungerösteten Probe.

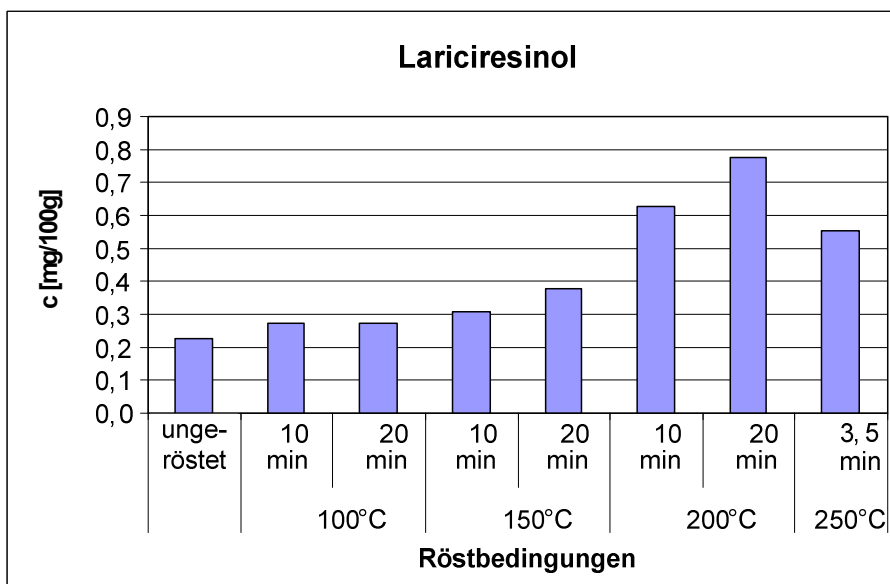


Abbildung 23: Freisetzung von LARI beim Rösten

Die freigesetzte Menge an LARI steigt mit zunehmender Temperatur an und erreicht bei einer Rösttemperatur von 200 °C/20 min den Maximalwert. Bei einer Rösttemperatur von 250 °C hat der Gehalt an LARI abgenommen, was auf eine Thermoinstabilität der Substanz hinweist.

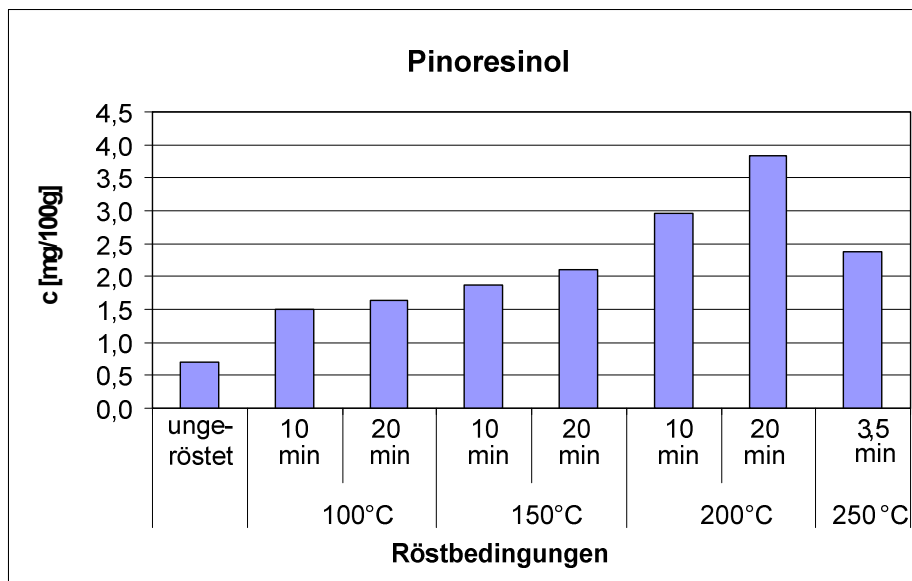


Abbildung 24: Freisetzung von PINO beim Rösten

Bereits bei einer Röstung ab 100 °C ist der PINO-Gehalt doppelt so hoch, als in der ungerösteten Probe. Bis zu einer Rösttemperatur von 200 °C steigt der PINO-Gehalt auf etwa das 5 fache des Ausgangswertes an, um dann bei einer Rösttemperatur von 250 °C um etwa ein Drittel des Maximalwertes abzunehmen.

5.4.3.1.3 Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natronlauge

Die basische Hydrolyse ermöglicht die Spaltung von Esterbindungen. Dabei werden glycosidisch gebundene Lignane freigesetzt und im Chromatogramm sichtbar. Aus dem vorherigen Versuch (siehe Abb. 20) ging hervor, dass SECO in freier Form nicht vorkommt, dass aber geringe Mengen an SDG vorliegen. Durch die basische Hydrolyse werden vorliegende Ester gespalten, sodass die Menge an SDG stark zunimmt (siehe Abb. 25).

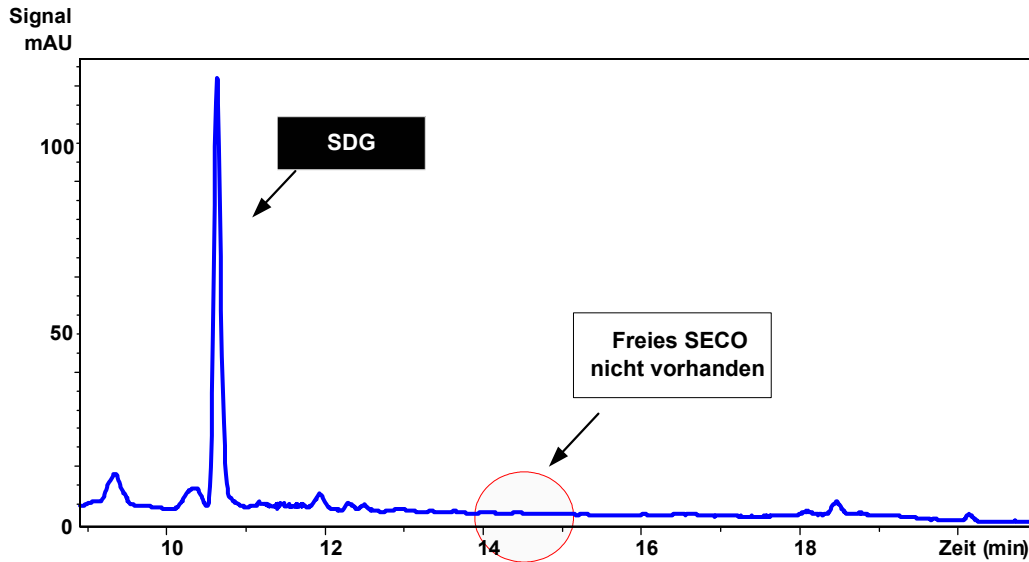


Abbildung 25: UV-Chromatogramm von SDG nach alkalischer Extraktion mittels NaOH (1:50 verdünnt mit Acetonitril/Wasser, 20:80; v:v)

Aufgrund der hohen Konzentrationen an SDG im Leinsamen wurde SDG mittels UV-Detektion bei 280 nm detektiert. Um den Gehalt an SDG bestimmen zu können, wurde eine Kalibriergerade von SECO erstellt. Weiters wurde die Steigung k der Kalibriergerade von SECO durch das Molekulargewicht von SDG dividiert und anschließend mit dem Molekulargewicht von SECO multipliziert. Damit konnte der Gehalt an beiden Verbindungen in den Proben bestimmt werden.

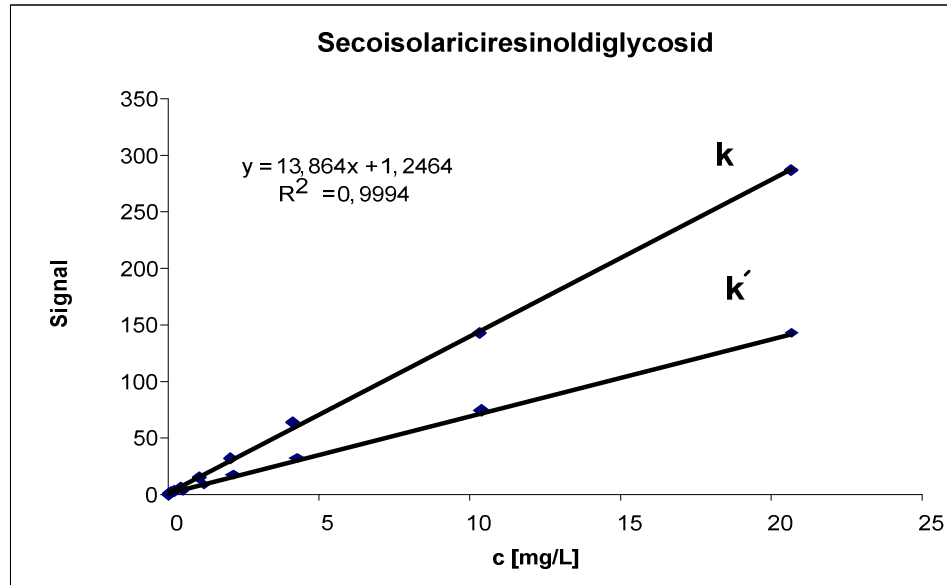


Abbildung 26: Kalibriergerade von SECO und SDG detektiert bei 280 nm

	SECO		SDG
k	13,86	k'	7,31
d	1,24	d	1,24

Tabelle 15: k von SECO umgerechnet auf k' von SDG

		Konzentration mg/100 g	
Proben		SDG	SECO
ungeröstet		1098,57	579,71
100 °C	10 min	1124,88	593,59
100 °C	20 min	1126,60	594,50
150 °C	10 min	1131,72	597,20
150 °C	20 min	1152,14	607,98
200 °C	10 min	1185,13	625,39
200 °C	20 min	1190,92	628,45
250 °C	3,5 min	1200,30	633,40

Tabelle 16: Konzentration von SDG nach alkalischer Extraktion und die daraus errechneten SECO Werte

Aus dieser Tabelle sind die Konzentrationen an SDG ersichtlich, sowie die daraus berechneten Konzentrationen an SECO.

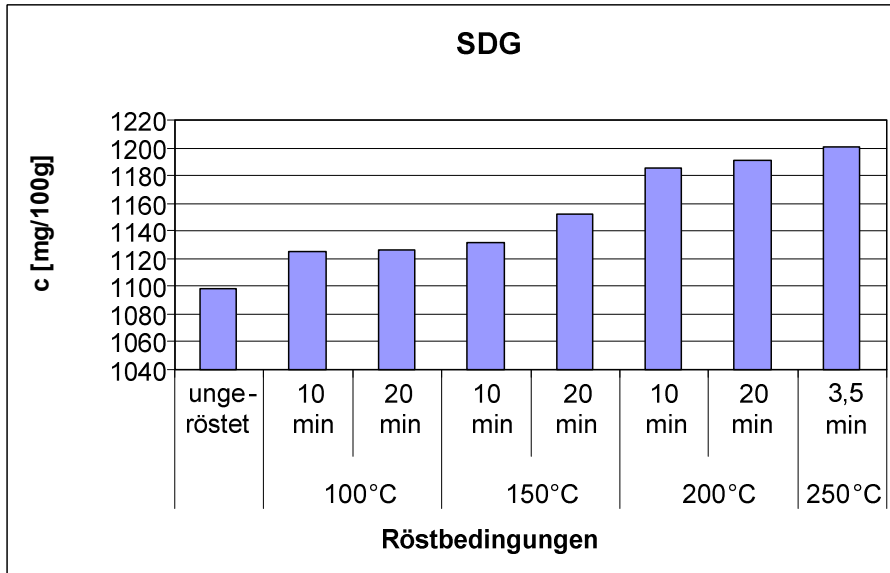


Abbildung 27: Freisetzung von SDG beim Rösten

Auch im Fall von SDG führt der Röstprozess zu einer Zunahme der freigesetzten Menge. Diese ist jedoch prozentuell gesehen nicht so groß, wie bei den vorangegangenen Untersuchungen.

5.4.3.1.4 Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natronlauge + enzymatische Hydrolyse

Durch die basische Vorbehandlung und der folgenden enzymatischen Hydrolyse werden sowohl Esterbindungen als auch glycosidische Bindungen gespalten und die Aglycone freigesetzt. Damit kann der Gesamtignangehalt im Leinsamen bestimmt werden. Durch Vergleich der Probenchromatogramme mit jenen der Standardsubstanzen konnten ISO, SECO, LARI und PINO (siehe Abb. 28) identifiziert werden.

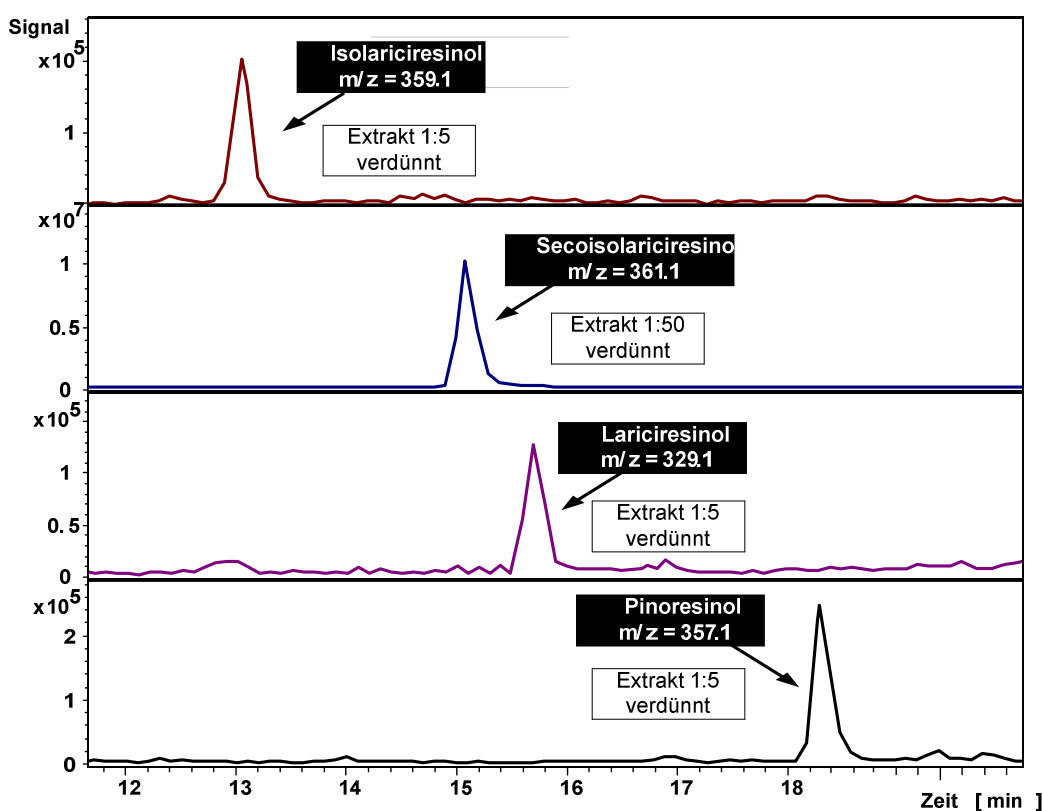


Abbildung 28: ESI-MS-Chromatogramme von den im Leinsamen freigesetzten Lignanen nach einer alkalisch enzymatischen Hydrolyse (NaOH)

Für diese neue Messserie wurden die Eichfunktionen neu erstellt (siehe Abb. 29-33) und damit die Gehalte der einzelnen Lignane in der ungerösteten und in der gerösteten Probe bestimmt.

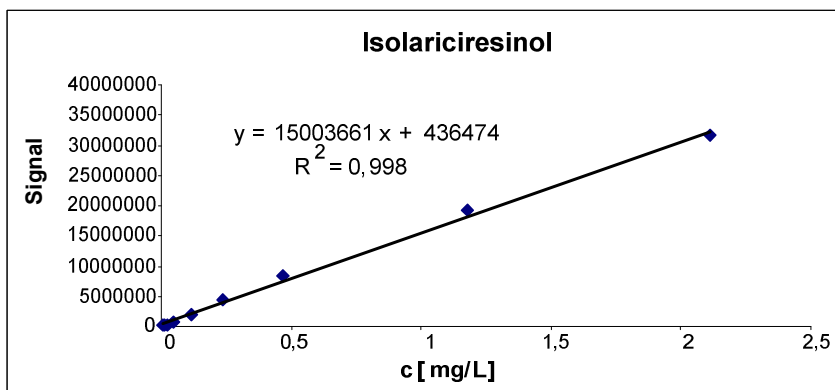


Abbildung 29: Kalibriergerade von ISO ($m/z = 359.1$)

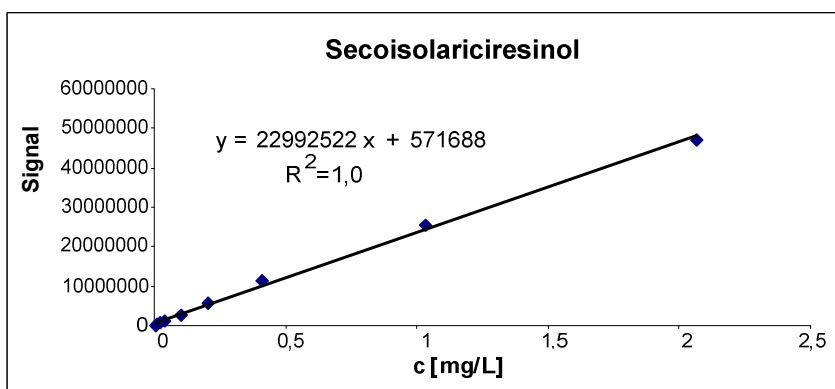


Abbildung 30: Kalibriergerade von SECO ($m/z = 361.1$)

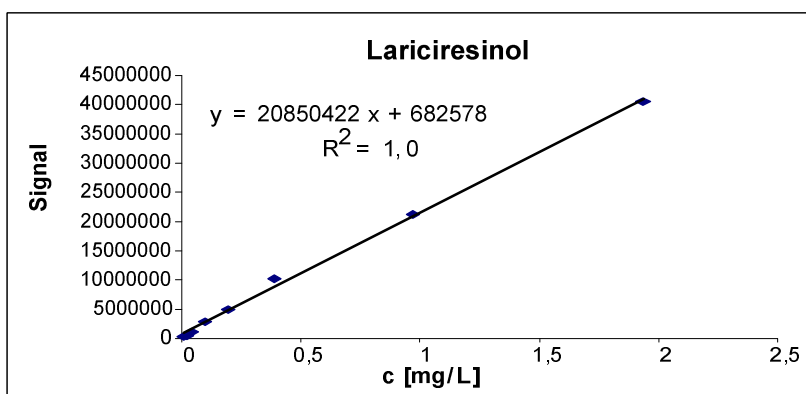


Abbildung 31: Kalibriergerade von LARI ($m/z = 329.1$)

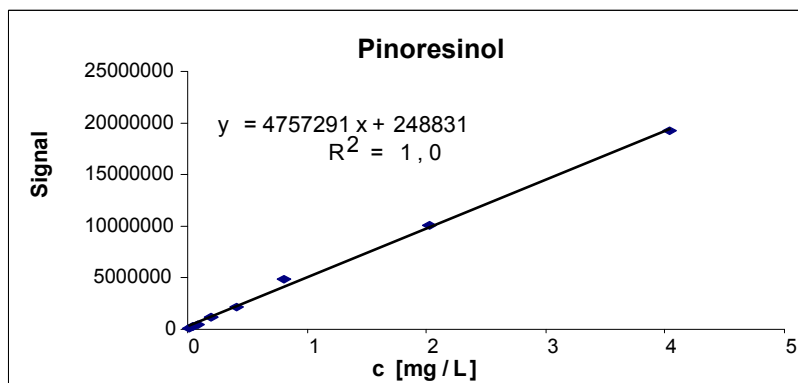


Abbildung 32: Kalibriergerade von PINO ($m/z = 357.1$)

Die nach dieser Aufarbeitungsmethode erhaltenen Konzentrationen von SECO, LARI und PINO fielen deutlich höher aus als jene, die mit einer Extraktion mit Ethanol/Wasser und anschließender enzymatischen Hydrolyse (siehe Abb. 22-24) erhalten wurden. Es lässt sich aufgrund dieser Ergebnisse die Aussage treffen, dass der größte Teil der im Leinsamen vorhandenen Lignane estergebunden vorliegt und die Ester durch eine Extraktion mit Ethanol/Wasser nicht aufgeschlossen werden können.

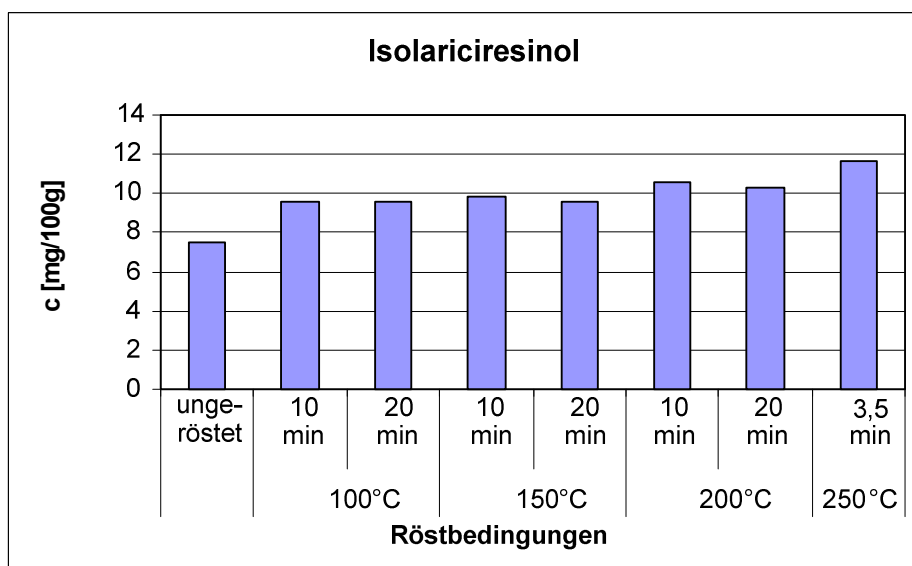


Abbildung 33: Freisetzung von ISO beim Rösten

Für ISO konnte bei der Röstung mit 100°C im Vergleich zur ungerösteten Probe ein Anstieg um 36% in der Konzentration festgestellt werden (siehe Abb. 33).

Weitere Temperaturerhöhungen (150 und 200°C) wirken sich nicht wesentlich auf die freigesetzte Konzentration des ISOs aus. Erst bei einer Röstung bei 250°C nimmt der ISO-Gehalt nochmal zu.

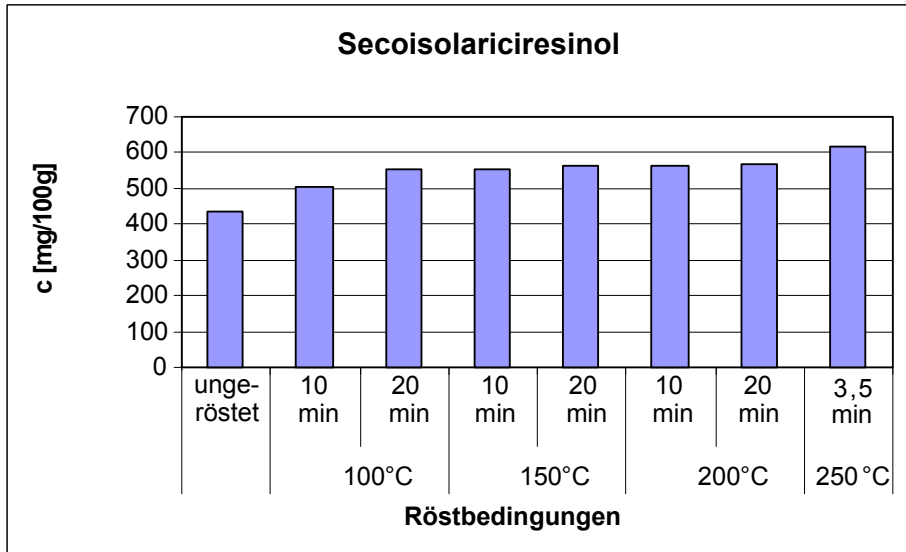


Abbildung 34: Freisetzung von SECO beim Rösten

Bereits bei einer Röstung bei 100°C/20 min nimmt der SECO-Gehalt um 29% zu. Eine weitere Temperaturerhöhung beim Rösten wirkt sich nennenswert auf die Freisetzung des SECOs aus. Der höchste Wert für SECO wird bei 250°C erreicht und liegt um 41% höher als jener der ungerösteten Probe.

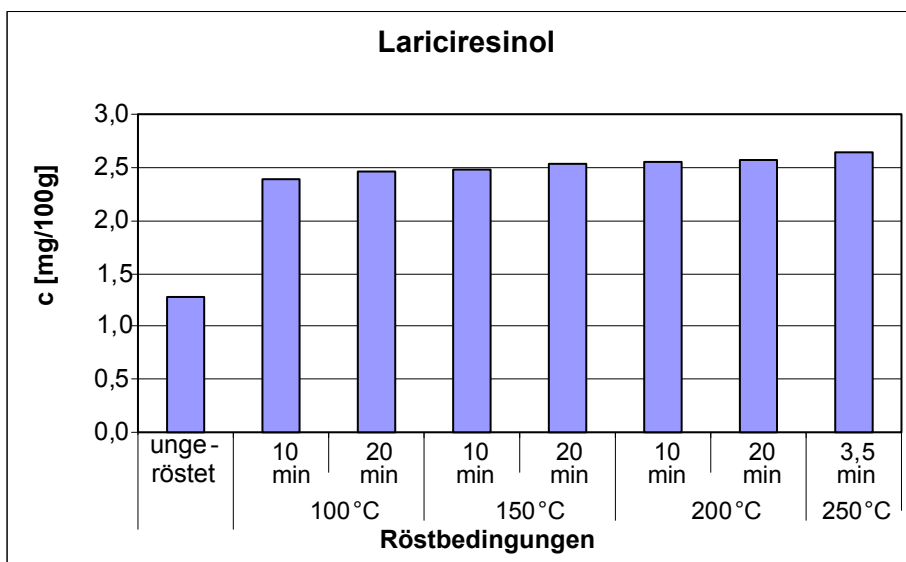


Abbildung 35: Freisetzung von LARI beim Rösten

Bei einer Röstung bei 100°C nimmt die freigesetzte Konzentration an LARI um 51% gegenüber der unbehandelten Probe zu. Weitere Temperaturerhöhungen beim Rösten beeinflussen den LARI-Gehalt nur geringfügig.

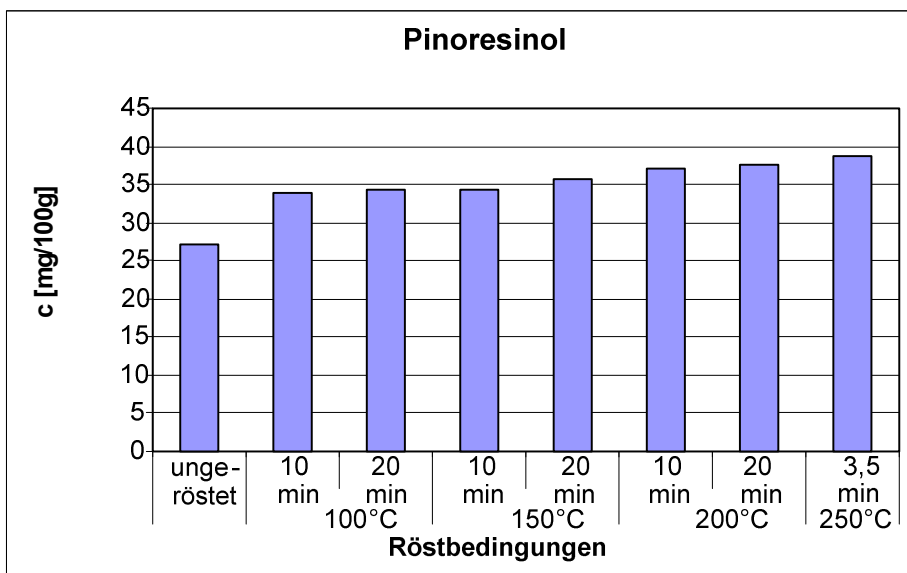


Abbildung 36: Freisetzung von PINO beim Rösten

Ähnlich wie bei SECO nimmt auch die freigesetzte Konzentration an PINO (30%) am meisten bei der ersten Röststufe (100°C) zu. Eine weitere Rösttemperaturerhöhung ändert die freigesetzte PINO-Konzentration nicht wesentlich.

Aus den bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass das Rösten von Leinsamen einen großen Einfluss auf die freigesetzte Konzentration der einzelnen Lignane hat. Durch Anwendung der alkalisch(NaOH) - enzymatischen Extraktion konnte der Gesamtliganengehalt bestimmt werden. Um eine exakte Aussage über die vorliegenden Konzentrationen treffen zu können, wurde eine Standardadditionsmethode durchgeführt und die Wiederfindung bestimmt, um später auch mittels Kalibrationsfunktionen auswerten zu können.

5.4.3.1.5 Wiederfindung nach der Extraktion mit Natronlauge und anschließender enzymatischen Hydrolyse

Da sich die Probenaufarbeitung aus mehreren Schritten zusammensetzt, bei denen Verluste auftreten können, war es erforderlich, die Wiederfindung zu bestimmen. Dazu wurden externe Kalibriergeraden und Standardadditionsgeraden der Lignane erstellt. Aus dem Verhältnis der Steigungen der Standardadditionsgeraden und der Kalibriergeraden konnte die die Wiederfindung der Lignane berechnet werden.

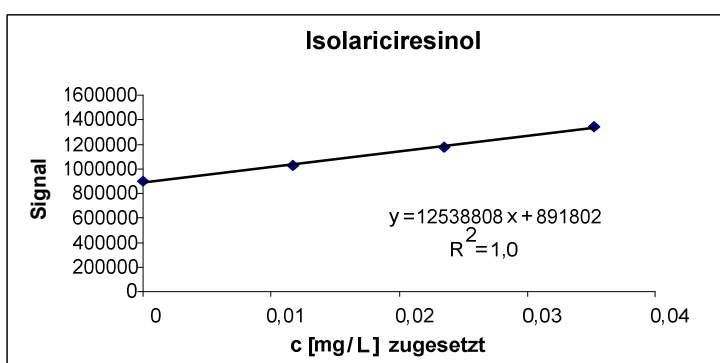


Abbildung 37: Standardadditionsgerade von ISO

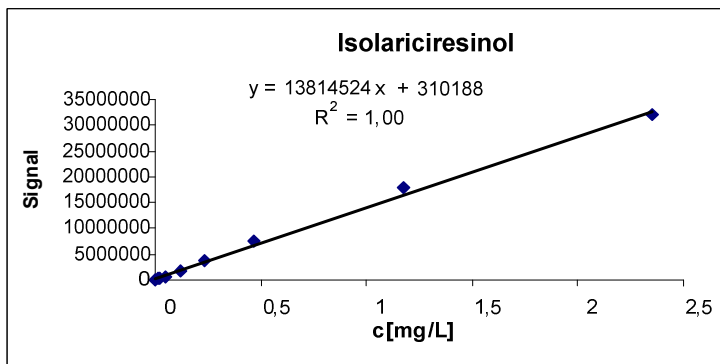


Abbildung 38: Externe Kalibrierfunktion von ISO

Auswertung:

ISOLARICIRE SINOL	
Steigung k_1 (ext.Kal.)	13814524
Steigung k_2 (Standadd.)	12538808
Ausbeute	90,77 %
Erhaltene c	7,14 mg/100 g

Tabelle 17: Wiederfindung und Gehalt an ISO im Leinsamen

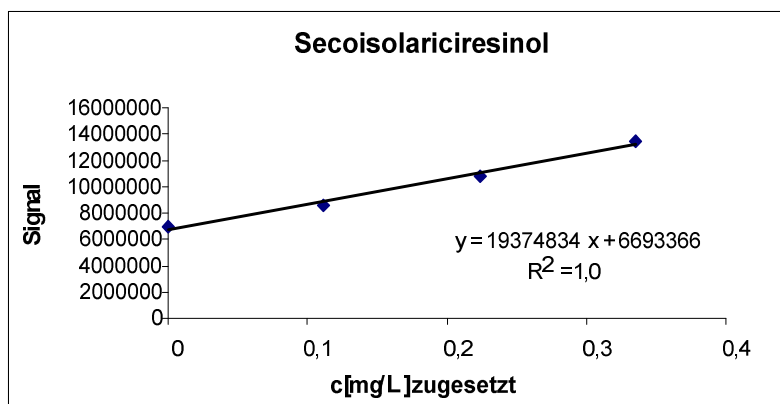


Abbildung 39: Standardadditionsgerade von SECO

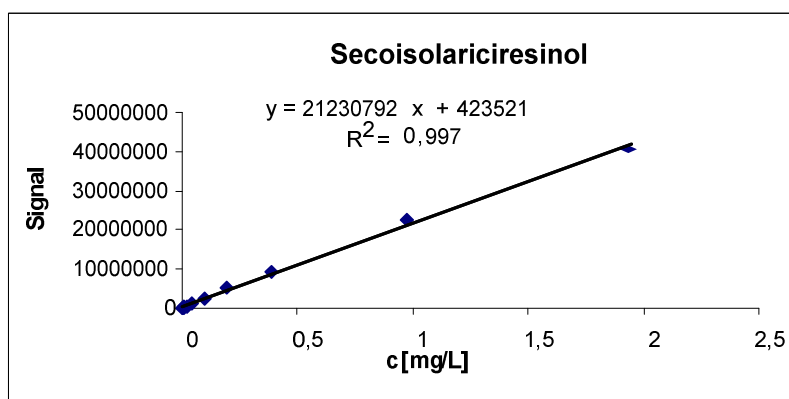


Abbildung 40: Externe Kalibrierfunktion von SECO

Auswertung:

SECOISOLARICIRE SINOL	
Steigung k_1 (ext.Kal.)	21230792
Steigung k_2 (Standadd.)	19374834
Ausbeute	91,26 %
Erhaltene c	433,53 mg/100 g

Tabelle 18: Wiederfindung und Gehalt an SECO im Leinsamen

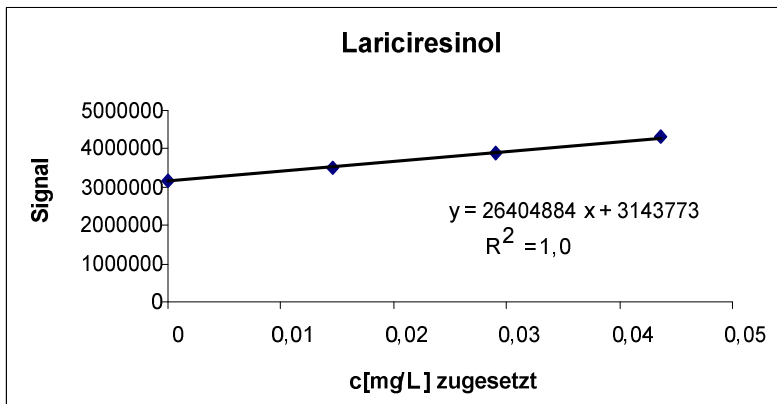


Abbildung 41: Standardadditionsgerade von LARI

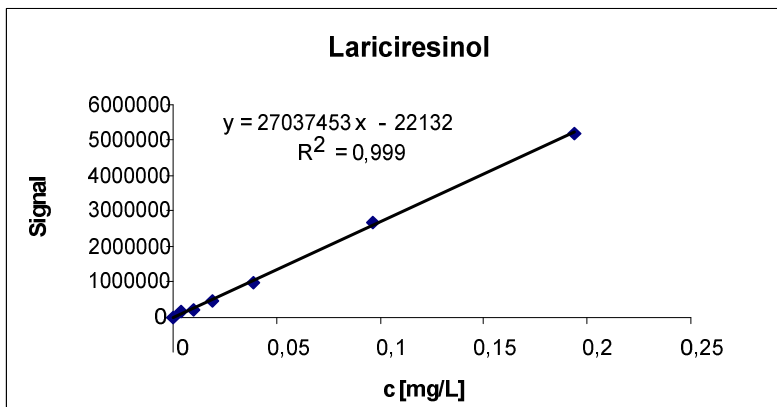


Abbildung 42: Externe Kalibrierfunktion von LARI

Auswertung:

LARICIRESINOL	
Steigung k_1 (ext.Kal.)	27037453
Steigung k_2 (Standadd.)	26404884
Ausbeute	97,66 %
Erhaltene c	2,09 mg/100 g

Tabelle 19: Wiederfindung und Gehalt an LARI im Leinsamen

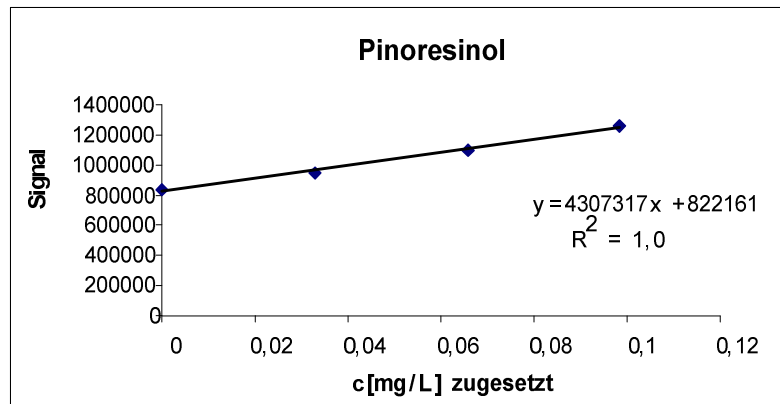


Abbildung 43: Standardadditionsgerade von PINO

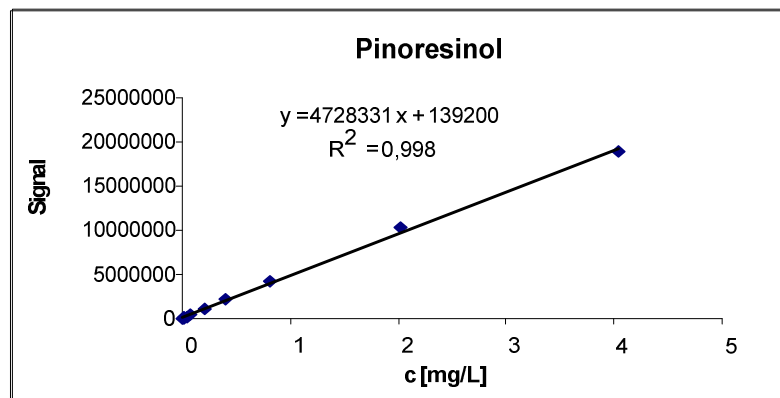


Abbildung 44: Externe Kalibrierfunktion von PINO

Auswertung:

PINORESINOL	
Steigung k_1 (ext.Kal.)	4728331
Steigung k_2 (Standadd.)	4307317
Ausbeute	91,10 %
Erhaltene c	33,54 mg/100 g

Tabelle 20: Wiederfindung und Gehalt an PINO im Leinsamen

Die Wiederfindungen der einzelnen Lignane liegen zwischen 90% und 97%. Man muss daher bei der alkalisch-enzymatischen Hydrolyse mittels NaOH kaum mit Verlusten bei der Aufarbeitung rechnen. Deswegen korrelieren die mit der Standardadditionsmethode und die mittels Kalibrierfunktionen erhaltenen Konzentrationen der ungerösteten Leinsamenprobe sehr gut.

5.4.3.1.6 Extraktion unter alkalischen Bedingungen mittels Natriummethoxid und anschließender enzymatischer Hydrolyse

Zusätzlich sollte noch eine Extraktion unter alkalischen Bedingungen mit NaOMe in Kombination mit enzymatischer Hydrolyse getestet werden, da diese Methode als milder gilt, als die Extraktion mit Natronlauge und anschließender enzymatischer Hydrolyse. Durch Vergleich der Analysenresultate konnten Unterschiede erkannt werden.

Wie aus Abb. 46 ersichtlich ist, werden durch diese Aufarbeitungsmethode ebenfalls ISO, SECO, LARI und PINO freigesetzt. Diese Substanzen wurden anschließend quantitativ erfasst

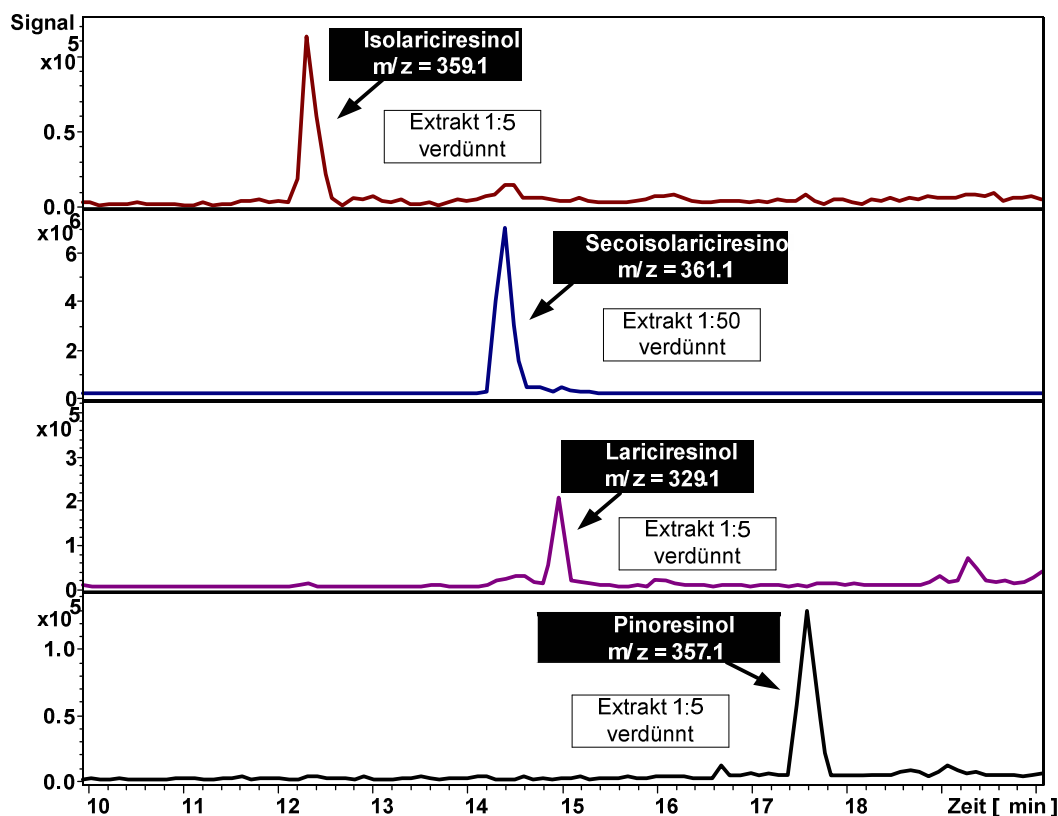


Abbildung 45: ESI-MS-Chromatogramme von den im Leinsamen freigesetzten Lignanen nach einer alkalisch enzymatischen Hydrolyse (NaOMe)

Mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden (Abb. 46-49) konnten unter Berücksichtigung der Wiederfindung folgende Konzentrationen ungerösteter und gerösteter Leinsamenproben ermittelt werden.

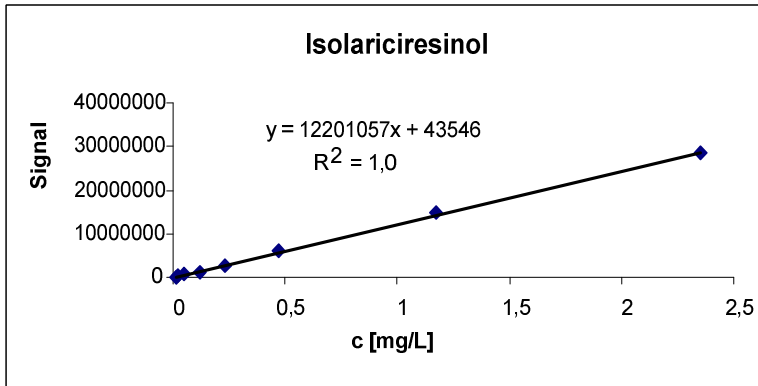


Abbildung 46: Kalibriergerade von ISO

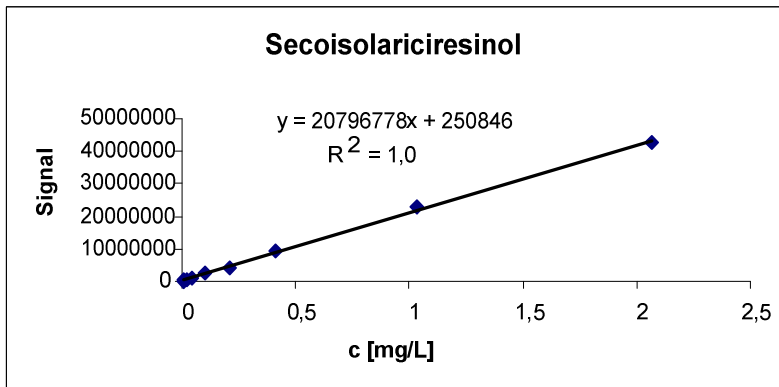


Abbildung 47: Kalibriergerade von SECO

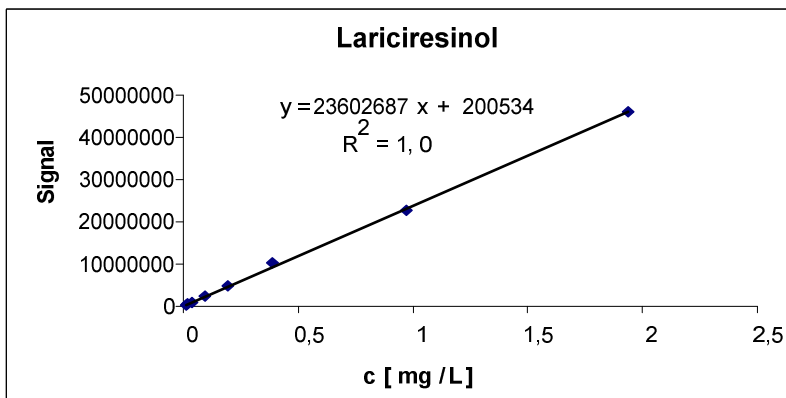


Abbildung 48: Kalibriergerade von LARI

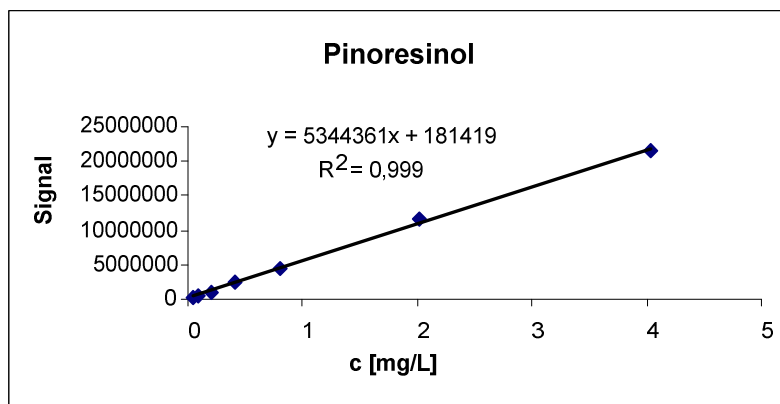


Abbildung 49: Kalibriergerade von PINO

Die Eichfunktionen wurden unmittelbar vor der Messung der Probenextrakte erstellt und ermöglichten somit eine exakte Bestimmung der vorliegenden Konzentrationen der Lignane.

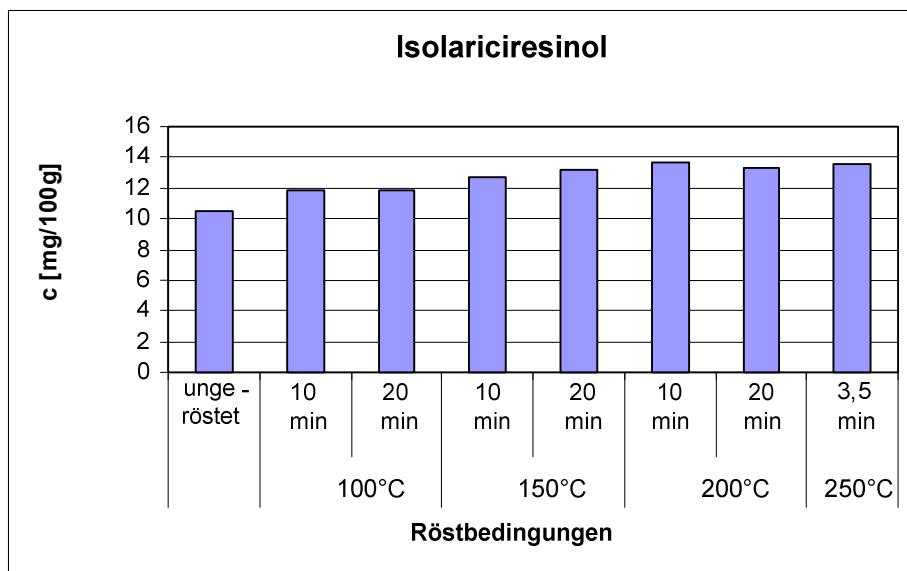


Abbildung 50: Freisetzung von ISO beim Rösten

Im Fall von ISO wirkt sich die Temperaturerhöhung beim Rösten nur geringfügig auf die zusätzlich freigesetzte Menge an ISO aus. Die größte Zunahme ist bei einer Rösttemperatur von 200 °C/10 min zu beobachten.

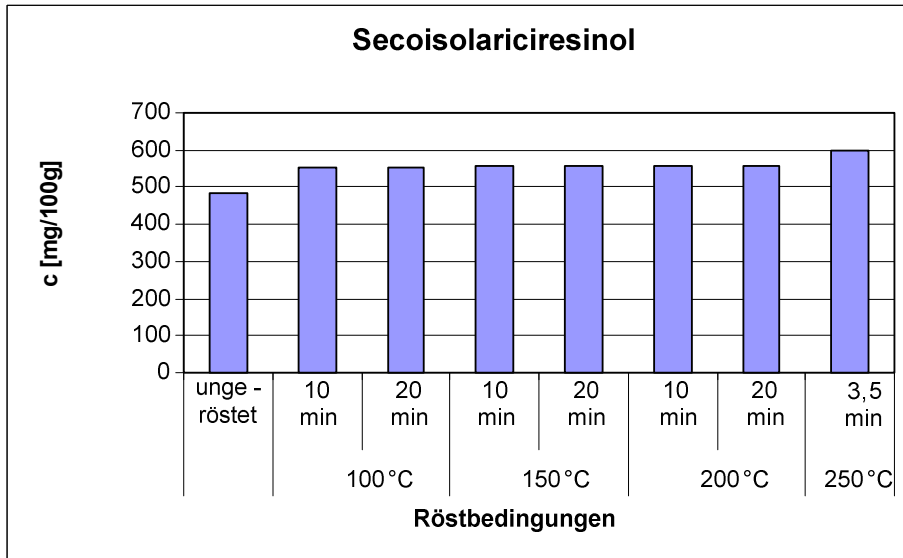


Abbildung 51: Freisetzung von SECO beim Rösten

Bei SECO beobachtet man bereits bei einer Röstung bei 100°C/20 min eine Konzentrationssteigerung (ca. 15%), die allerdings niedriger als bei der alkalisch (NaOH) enzymatischen Hydrolyse ist. Bei einer Röstung bei 250°C/3,5 min nimmt der Lignangehalt um etwa 25% im Vergleich zur ungerösteten Probe zu.

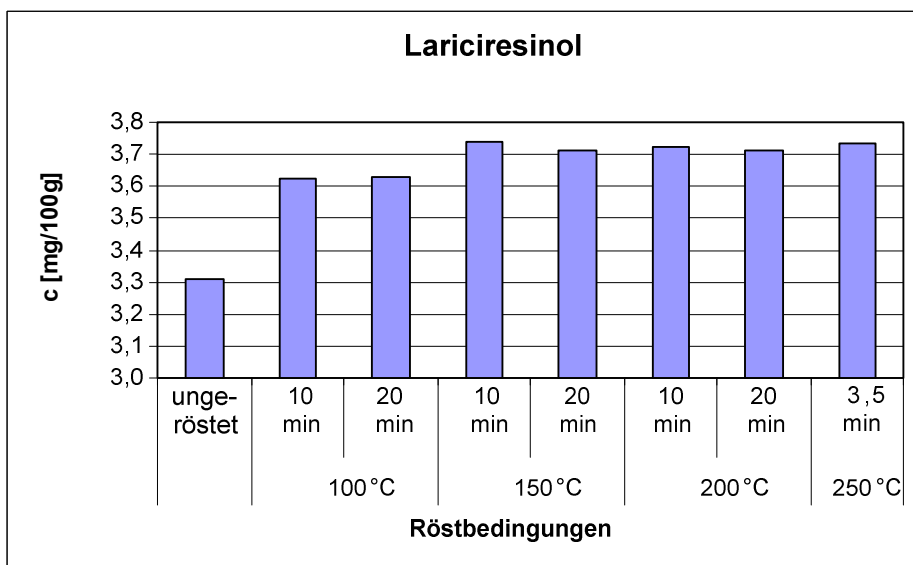


Abbildung 52: Freisetzung von LARI beim Rösten

Die LARI-Konzentration im Leinsamen ist gering. Durch Röstung bei 100°C nimmt sie im Vergleich zur ungerösteten Probe um etwa 11,5% zu. Weitere Temperaturerhöhungen bei der Röstung beeinflussen den LARI-Gehalt kaum.

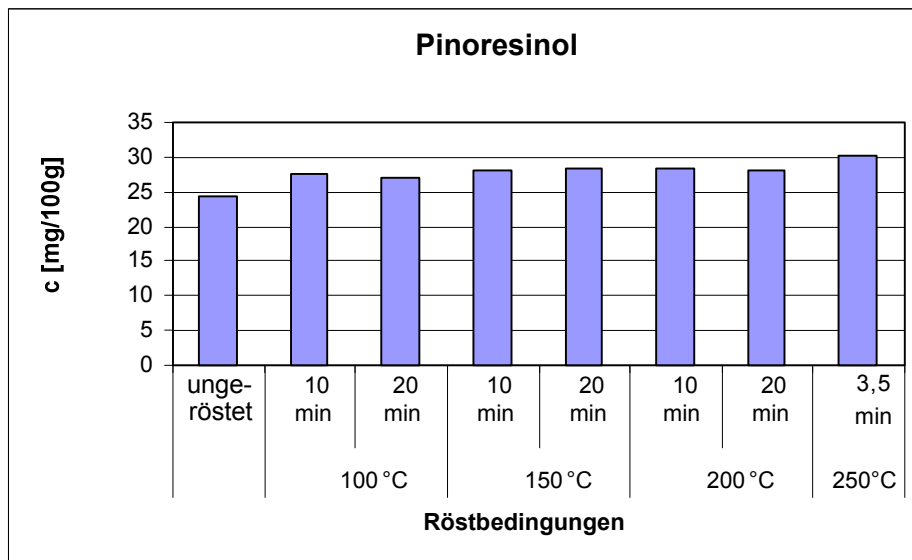


Abbildung 53: Freisetzung von PINO beim Rösten

Auch bei PINO tritt die größte Konzentrationszunahme (ca. 23%) nach einer Röstung bei 250°C/3.5 min auf, während bei 100°C/20 min nur ein Anstieg um etwa 10% zu beobachten ist.

Im Allgemeinen sind die Konzentrationssteigerungen dieser Methode von der ungerösteten zur gerösteten Probe deutlich niedriger ausgefallen als jene der alkalisch-enzymatischen Methode mittels NaOH. Das kann durchaus daran liegen, dass diese Methode mit NaOMe die Sanftere von den beiden ist.

5.4.3.1.7 Methodenvergleich

Zur besseren Übersicht werden die Ergebnisse der alkalisch-enzymatischen Hydrolyse mit NaOH und NaOMe zusammengefasst.

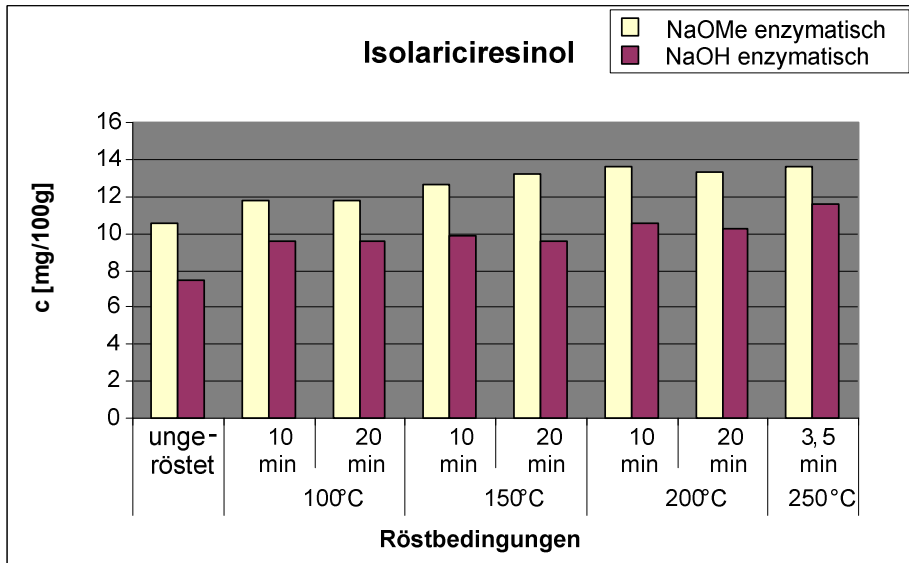


Abbildung 54: Konzentrationen von ISO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe

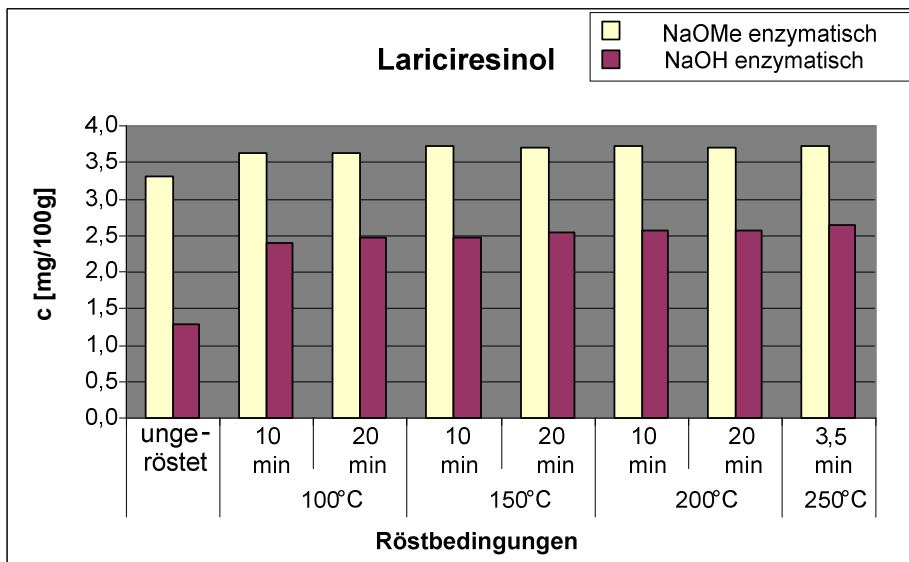


Abbildung 55: Konzentrationen von LARI im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe

Die alkalische Hydrolyse mit NaOMe liefert im Fall von ISO und LARI höhere Konzentrationen, bei SECO ist der Gehalt unabhängig von der verwendeten alkalischen Hydrolysemethode. Einzig bei PINO gelingt die Freisetzung mit Natronlauge besser als mit Natriummethoxid, was ein Hinweis auf eine andere Esterart sein könnte, in welcher PINO gebunden vorliegt.

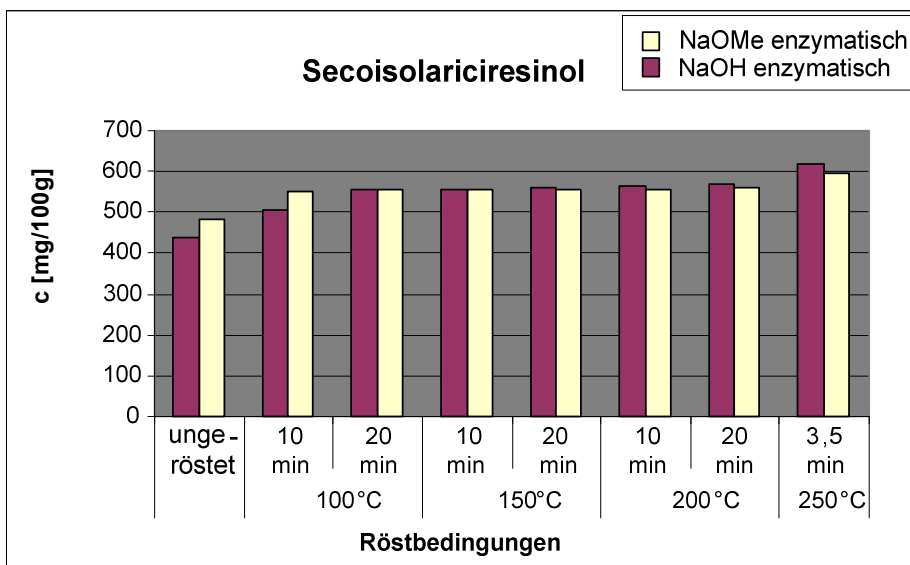


Abbildung 56: Konzentrationen von SECO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe

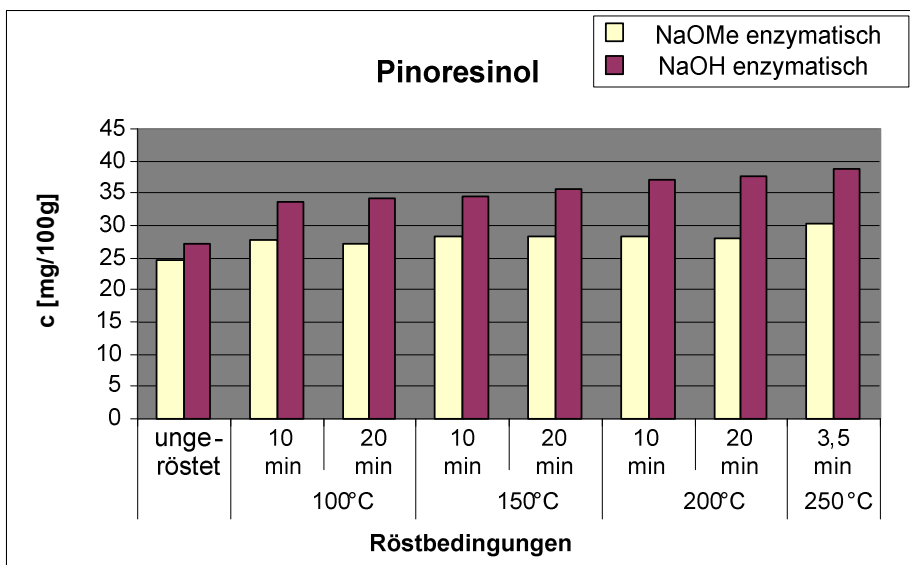


Abbildung 57: Konzentrationen von PINO im Leinsamen bei alkalischer Extraktion mit NaOH und NaOMe

Da die alkalische Hydrolyse mit Natronlauge weniger Zeit in Anspruch nimmt und man ausserdem nicht der Gefahr ausgesetzt ist, mit elementarem Natrium arbeiten zu müssen, würde ich diese Extraktionsmethode bevorzugen. Um jedoch von jedem Lignan die maximal erreichbaren Konzentrationen zu ermitteln, lässt es sich nicht vermeiden, mit beiden Extraktionsmethoden zu arbeiten.

5.4.3.2 Optimierung der enzymatischen Hydrolyse

Abschließend sollte noch untersucht werden, ob das verwendete Enzym oder die eingesetzte Enzymmischung, bei der Anwendung der alkalischen Extraktion mit Natriummethoxid und mit Natronlauge einen Einfluss auf die Konzentration der Lignane hat.

Um den Einfluss der Enzyme auf die Freisetzung der Lignane vergleichen zu können, wurden jeweils die gleichen Mengen an *Helix pomatia*, Cellulase oder beiden Enzymarten zum Extrakt zugesetzt und inkubiert. Es ergaben sich jedoch nur geringe Konzentrationsunterschiede und man konnte feststellen, dass die Wahl der Enzyme bei diesen Aufarbeitungsmethoden eine untergeordnete Rolle spielt (Tab. 21).

Aufarbeitungsmethode: NaOMe + Enzym				
	Konzentration in mg/100 g			
Enzymart	ISO	SECO	LARI	PINO
Helix pomatia	9,88	410,24	3,03	30,83
Helix pomatia	10,98	447,58	3,49	28,47
Mittelwert	10,43	428,91	3,26	29,65
Standardabweichung	0,78	26,41	0,33	1,67
RSD	7,47	6,16	10,01	5,64
Cellulase	9,75	491,99	3,10	29,48
Cellulase	10,77	512,77	3,98	26,44
Mittelwert	10,26	502,38	3,54	27,96
Standardabweichung	0,72	14,69	0,62	2,15
RSD	7,07	2,92	17,66	7,70
Helix pomatia + Cellulase	10,53	487,73	3,25	32,99
Helix pomatia + Cellulase	11,61	514,76	3,69	25,66
Mittelwert	11,07	501,25	3,47	29,32
Standardabweichung	0,77	19,11	0,31	5,19
RSD	6,92	3,81	8,90	17,69

Tabelle 21: Einfluss der Enzyme auf die Freisetzung der Lignane

Aufarbeitungsmethode: NaOH + Enzym				
Enzymart	ISO	SECO	LARI	PINO
Helix pomatia	9,52	383,20	2,83	31,85
Helix pomatia	9,91	422,18	3,22	26,65
Mittelwert	9,71	402,69	3,03	29,25
Standardabweichung	0,27	27,56	0,28	3,67
RSD	2,78	6,84	9,16	12,56
Cellulase	9,47	437,15	2,83	35,23
Cellulase	10,73	497,47	3,44	32,26
Mittelwert	10,10	467,31	3,14	33,75
Standardabweichung	0,89	42,66	0,44	2,11
RSD	8,81	9,13	13,91	6,24
Helix pomatia + Cellulase	10,10	454,24	3,14	35,43
Helix pomatia + Cellulase	9,91	495,91	3,55	29,29
Mittelwert	10,01	475,07	3,35	32,36
Standardabweichung	0,13	29,47	0,29	4,34
RSD	1,30	6,20	8,70	13,42

Tabelle 22: Einfluss der Enzyme auf die Freisetzung der Lignane

Diese Versuchsreihe bestätigt, dass die nach der alkalischen Hydrolyse mit Natronlauge verwendeten Enzyme keinen Einfluss auf die freigesetzte Menge der Lignane haben.

6 Schlussbetrachtung

Das Ziel dieser Arbeit war, eine optimale Aufarbeitungs- bzw. Extraktionsmethode für die Lignane im Leinsamen zu ermitteln und darüber hinaus einige Informationen über die jeweiligen Strukturen der einzelnen Lignane im Leinsamen zu erhalten. Weiters wurde ein Vergleich der Lignankonzentrationen in gerösteten und ungerösteten Proben aufgestellt und daraus ein Hinweis erhalten, ob die Hitzeeinwirkung auf die freigesetzten Lignangehalte eine positive bzw. negative Wirkung hat.

Die Leinsamenkörner wurden entweder geröstet (Rösttemperatur: 100°C – 250°C; Röstdauer 10 min oder 20 min) oder ungeröstet mittels Soxhlet-Extraktion entfettet. Dann wurden die fettfreien Proben getrocknet und darüber hinaus unterschiedlichen Hydrolysemethoden unterzogen. Die experimentellen Parameter wie Dauer und Temperatur der einzelnen Methoden wurden von publizierten Extraktionsmethoden übernommen und gegebenenfalls optimiert. Die Bestimmung erfolgte mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektor gekoppelt mit einem ESI-ION-TRAP-Massenspektrometer. Die MS-Einstellungen wurden hinsichtlich der Lignane optimiert und die charakteristischen m/z Verhältnisse für die Lignane ermittelt.

Es konnten 4 Lignane im Leinsamen (ISO, SECO, LARI, PINO) sowohl qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden. Zu Beginn wurde eine Extraktion mit Ethanol/Wasser (70:30; v:v) im Ultraschallbad durchgeführt. Da mit dieser Methode keines der vier Lignane detektiert werden konnte, wurde das Vorhandensein von freien Aglykonen im Leinsamen ausgeschlossen. Nach anschließender enzymatischer Hydrolyse konnten SECO, LARI und PINO, wenn auch nur in geringen Konzentrationen, nachgewiesen werden. Diese entsprachen dem Anteil an nicht veresterten glycosidisch gebundenen Lignanen im Leinsamen.

Eine Extraktion unter alkalischen Bedingungen mit Natronlauge im Ultraschallbad machte eine Spaltung der Esterbindungen möglich. Danach waren sehr große Mengen an SDG nachweisbar, freies Aglycon war jedoch nicht vorhanden. Daraus ergibt sich, dass SECO im Leinsamen zum Großteil

verestert aber auch glycosidisch gebunden vorliegt. Eine anschließende enzymatische Hydrolyse mittels *Helix pomatia* juice + Cellulase lieferte die höchsten Gehalte an ISO, SECO, LARI und PINO und damit den Gesamtlignangehalt.

Bei einem Vergleich der alkalischen Extraktion mittels NaOMe und NaOH und darauf folgender enzymatischer Hydrolyse ergaben sich nur geringe Unterschiede in den Konzentrationen der einzelnen Lignane. SECO und PINO ließen sich mit Natronlauge besser freisetzen, ISO und LARI wiesen höhere Konzentrationen nach einem Aufschluss mittels Natriummethoxid auf.

Eine wesentliche Frage war, wie sich die Lignane des Leinsamens unter Einfluss von Hitze verhalten. Erwartet wurde, was auch aus vorherigen Publikationen hervorging, dass die Konzentrationen bei den gerösteten Proben ab gewissen Temperaturen sinken. Es war jedoch genau das Gegenteil feststellbar, denn bei allen Aufarbeitungsmethoden kam es teilweise zu einer Konzentrationssteigerung der einzelnen Lignane um bis zu 50% je nach den erfolgten Röstbehandlungen. Das Konzentrationsmaximum war stets in den höchsten Temperaturbereichen zu finden, wodurch man eine Hitzeinstabilität der vier untersuchten Lignane im Leinsamen ausschließen kann. Die Gehaltszunahme ist auf die Veränderungen im Leinsamen durch das Rösten zurückzuführen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Samenkörner durch die Hitze porös werden und das Lösungsmittel bei der Extraktion die Lignane besser extrahieren kann. Eine Zerstörung der Lignane unter den gewählten Röstbedingungen fand nicht statt. Eine fundierte Aussage über die Lignanstabilität nach einer Hitzebehandlung kann aber nur dann getroffen werden, wenn andere lignanhaltige Lebensmittel untersucht werden, in denen die Lignane in verschiedenen Bindungsformen vorliegen.

7 Zusammenfassung

Lignane verfügen über eine Vielzahl von positiven Eigenschaften und gewinnen daher immer mehr an Bedeutung. Sie gehören zur Oberklasse der Phytoöstrogene, östrogenähnliche Stoffe, die auch als Antioxidantien wirken und spielen eine unterstützende Rolle in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs. Überdies sind sie in der Lage antivirale, antibakterielle und fungistatische Effekte zu erzeugen und verursachen je nach Konzentration eine östrogene bzw. antiöstrogene Wirkung. Lignane werden in zahlreichen Lebensmitteln wie Samen, Hülsenfrüchten, Getreide, Obst und Gemüse nachgewiesen. Diese genannten Lebensmittel werden jedoch häufig nicht als Rohprodukte verzehrt, sondern weiter verarbeitet bzw. gekocht genossen. Daher ist es von außerordentlicher Bedeutung, diese vorteiligen Pflanzenstoffe auch nach Verarbeitungsprozessen im Lebensmittel zu erhalten und damit den gesundheitlichen Nutzen zu fördern.

In der vorliegenden Arbeit wurden wasserlösliche Lignane auf deren Stabilität gegenüber Hitze in Form von Rösten (Rösttemperatur: 100°C – 250°C; Röstdauer 10 oder 20 min) getestet. Dafür wurden bisher publizierte Lignanaufarbeitungsmethoden nach PENALVO et al. 2005, MILDNER et al. 2004 und SMEDS et al. 2007, übernommen und optimiert. Es kam zur Anwendung einer Extraktion mit Ethanol/Wasser und anschließender enzymatischen Hydrolyse sowie einer alkalischen Extraktion mittels NaOH bzw. NaOMe und anschließender enzymatischen Hydrolyse. Aufgetrennt und detektiert wurden die Lignane mittels Reversed-Phase HPLC gekoppelt mit einem HCT-plus Ionenfallen-Massenspektrometer. Eine ESI-MS Methode im negativen Modus über den scannenden Betrieb als auch über den Isolierungs-MRM-Modus sowie eine LC-UV Methode bei 280 nm wurde ausgearbeitet, um die Lignankonzentrationen in ungerösteten und gerösteten Leinsamenproben zu ermitteln. Anschließend wurden die freigesetzten Gehalte der einzelnen Lignane miteinander verglichen und die optimale Extraktionsmethode bestimmt. Es kam zu signifikanten Konzentrationssteigerungen der untersuchten Lignane (bis zu 50%) nach den Röstprozessen. Die Konzentrationsmaxima lagen stets

in den höchsten Temperaturbereichen, was darauf schließen lässt, dass wasserlösliche Lignane im Leinsamen gegenüber hohen Temperaturen während Röst- und Backprozesse stabil sind und nicht zerstört werden.

Es besteht also durchaus die Möglichkeit, Leinsamen in Form von Mehl zum Brotbacken einzusetzen oder Leinsamenöl zu erzeugen und durch die Erhaltung der Lignane das Spektrum an Lebensmitteln, welche auf Menschen eine gesundheitsfördernde Wirkung haben, zu erweitern.

8 Summary

Lignans have been reported capable of exerting a wide range of positive effects and therefore there has been a growing interest in these compounds. Lignans are phytoestrogens with estrogenic properties, they serve as antioxidant and protect against coronary heart diseases and cancer. Moreover they are supposed to induce biological effects, such as antiviral, antibacterial, antifungal and depending on the concentration level estrogenic and antiestrogenic activities. Lignans are present in a variety of plant foods like seeds, legumes, cereals, fruits and vegetables. Many foodstuffs are not consumed as raw products but in a processed form. Therefore it is of exceeding importance to keep alive these providential substances after heating treatments to advocate the health benefit.

In this study the stability of water-soluble lignans in linseed while heating in form of roasting (roast-temperature: 100°C – 250°C; roast-time: 10 or 20 min) were tested. Therefore sample preparation methods for lignan analysis of so far published literature by PENALVO et al. 2005, MILDNER et al. 2004 und SMEDS et al. 2007, were adopted and optimized. Linseed samples were worked up by extraction with aqueous ethanol followed by enzymatic hydrolysis, as soon as alkaline extraction done by NaOH and NaOMe and followed by enzymatic hydrolysis. Chromatographic analysis was performed by reversed phase high performance liquid chromatography coupled with HCT-plus Iontrap mass spectrometry. A detection method by ESI-Mass spectrometry in the negative mode using characteristic deprotonated molecular ions and the daughter ions after isolation and fragmentation (MRM-mode) and by HPLC-UV-MS (280 nm) was developed. The concentrations of lignans in unroasted and roasted samples of linseed were quantified. According to the received yields of lignans the different sample preparation methods were compared and the most representative method for application was chosen. After roasting processes significant increases of the lignan concentrations were determined (up to 50%) and the maximum of the amount of lignans were found at the highest temperatures. These findings gave us the reason to say that water-soluble

lignans in linseed are thermally stable. On the basis of these effects there exists the possibility to apply linseed meal for baking bread and produce linseed oil to enlarge the spectrum of foods, which causes constitutional effects on human being.

9 Literaturverzeichnis

ADLERCREUTZ, H.; HÖCKERSTEDT, K.; BANNWART, C.; BLOIGU, S.; HÄMÄLÄINEN, E.; FOTSIS, T.; OLLUS, A. (1987). „Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG)”. J. Steroid. Biochem. **27**: 1135-1144.

ADLERCREUTZ, H. (1990a). “Diet, breast cancer, and sex hormone metabolism”. Ann. N. Y. Acad. Sci. **595**: 281-290.

ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HÄMÄLÄINEN, E.; HASEGAWA, T.; OKADA, H. (1991a) “Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming traditional Japanese diet”. Am. J. Clin. Nutr. **54**: 1093-1100.

ADLERCREUTZ, H.; MOUSAVI, Y.; LOUKOVAARA, M.; HÄMÄLÄINEN, E. (1991b). “Lignans, isoflavones, sex hormone metabolism and breast cancer. In: Hochberg, R.B.; Naftolin, F. (eds.). The new biology of steroid hormones. Serono Symposia Publications Vol **74**, Raven Press, New York : 145-154.

ADLERCREUTZ, H.; HÄMÄLÄINEN, E.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. (1992a). “Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan”. Lancet **339**: 1233.

ADLERCREUTZ, H.; MOUSAVI, Y.; CLARK, J.; HÖCKERSTEDT, K.; HÄMÄLÄINEN, E.; WÄHÄLÄ, K.; MÄKELÄ, T.; HASE, T. (1992b). “Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies”. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. **41**: 331-337.

ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. (1997). “Phytoestrogens and western diseases”. Ann. of Med. **29**: 95-120.

ADLERCREUTZ, H. (2007). “Lignans and human health”. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **44**: 483-525.

AXELSON, M.; SETCHELL, K.D.R. (1980). “Conjugation of lignans in human urine”. FEBS Lett. **122**: 49-53.

BAMBAGIOTTI-ALBERTI, J.M.; CORAN, S.A.; GHIARA, C.; GIANNELLINI, V.; RAFFAELLI, A. (1994). “Investigation of mammalian lignan precursors in flaxseed: first evidence of secoisolariciresinol diglucoside in two isomeric forms by liquid chromatography/mass spectrometry”. Rapid Commun. Mass. Spectrom. **8**: 929-932.

BRENES, M.; GARCÍA, M.; DOBARGANES, C.; VELASCO, J.; ROMERO, C. (2002). "Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil". J. Agric. Food Chem. **50**: 5962-5967.

BUDZIKIEWICZ, M.; SCHÄFER, M. Terminologie; Einlasssystem; Ionenquellen; Analysatoren; Qualitative und quantitative Analyse von Gemischen. In: Massenspektrometrie: Eine Einführung. Wiley-VCH, Weinheim, 2005: 7-9; 12-13; 18-19; 37;88

CHEN, J.; WANG, L.; THOMPSON, L.U. (2006). "Flaxseed and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice". Cancer Letters **234**: 168-175.

DOMINIK, A.; STEINHILBER, D. Teil 2: Chromatographische Methoden. In: Instrumentelle Analytik: Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2002; 143-146.

ELIASSON, C.; KAMAL-ELDIN, A.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. (2003). "High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction". J. Chromatogr. A **1012**: 151-159.

HARWORTH, R.D. (1936). "Natural resins". Ann. Rep. Prog. Chem. **33**: 266–279.

HEDELIN, M.; KLINT, A.; CHANG, E.T.; BELLOCCO, R.; JOHANSSON, J.E.; ANDERSSON, O.; HEINONEN, S.M.; ADLERCREUTZ, H.; ADAMI, H.O.; GRÖNBERG, H.; BÄLTER, K.A. (2006). "Dietary phytoestrogen, serum enterolactone and risk of prostate cancer: the Cancer Prostate Sweden Study (Sweden)". Cancer Caus. Control. **17**: 169–180.

HEMALATHA, S.; GHAFLOORUNISSA. (2007). "Sesame lignans enhance the thermal stability of edible vegetable oils". Food Chem. **105**: 1076-1085.

HYVÄRINEN, H.K.; PIHLAVA, J.M.; HIIDENHOVI, J.A.; HIETANIEMI, V.; KORHONEN, H.J.T.; RYHÄNEN, E.L. (2006). "Effect of processing and storage on the stability of flaxseed lignan added to dairy products". J. Agric. Food Chem. **54**: 8788-8792.

JORDAN, V.C.; KOCH, R.; BAIN, R.R. (1985). "Prolactin synthesis by cultured rat pituitary cells: An assay to study estrogens, antiestrogens and their metabolites in vitro". In: Estrogens in the Environment II: Influences and Development (McLACHLAN, J.A., Ed.). Elsevier, New York: 221-237.

KAMAL-ELDIN, A.; PEERLKAMP, N.; JOHNSON, P.; ANDERSSON, R.; ANDERSSON, R.E.; LUNDGREN, L.N.; AMAN, P. (2001). "An oligomer from flaxseed composed of secoisolariciresinoldiglucoside and 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid residues". Phytochem. **58**: 587–590.

KITTS, D.D.; YUAN, Y.V.; WIJECHREME, A.N.; THOMPSON, L.U. (1999). "Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone". Mol. Cell. Biochem. **202**: 91-100.

KRAUSHOFER, T.; SONTAG, G. (2002). "Determination of matairesinol in flax seed by HPLC with coulometric electrode array detection". J. Chromatogr. B **777**: 61-66.

KULLING, S.; WATZL, B. (2003). "Phytoöstrogene". Ernährungs-Umschau **50**: 234-239.

LAMPE, J.W.; MARTINI, M.C.; KURZER, M.S.; ADLERCREUTZ, H.; SLAVIN, J.L. (1994). "Urinary lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder". Am. J. Clin. Nutr. **60**: 122-128.

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S.A. (1998). "Extraction and quantification of daidzein and genistein in food". Anal. Biochem. **264**: 1-7.

LIGGINS, J.; GRIMWOOD, R.; BINGHAM, S.A. (2000). "Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples". Anal. Biochem. **287**: 102-109.

MAZUR, W.; FOTSIS, T.; WAHALA, K.; OJALA, S.; SALAKKA, A.; ADLERCREUTZ, H. (1996). "Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of isoflavonoids, coumestrol and lignans in food samples". Anal. Biochem. **233**: 169–180.

MEAGHER, L.P.; BEECHER, G.R. (2000). "Assessment of data on the lignan content of foods". J. Food Comp. Anal. **13**: 935-947.

MESSINA, M.; MESSINA, V. (1991). "Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention". J. Am. Diet Assoc. **91**: 836-840.

MILDER, E.J.; ARTS, I.C.W.; VENEMA, D.P.; LASAROMS, J.J.P. (2004). "Optimization of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Quantification of the Plant Lignans Secoisolariciresinol, Matairesinol, Lariciresinol, and Pinoresinol in Foods". J. Agric. Food Chem. **52**: 4643-4651.

MILDER, I.E.; ARTS, I.C.; VAN DE PUTTE, B.; VENEMA, D.P.; HOLLMAN, P.C. (2005) "Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol". Br. J. Nutr. **93**: 393-402.

MILOVANOVIC, M. (2007).

Dissertationsthema: "Asymmetrische Synthese von Dibenzylbutan- und Dibenzylbutyrolacton-Lignan". 1. Auflage 2007. Verlagsgruppe Mainz GmbH Aachen.

MOUSAVI, Y.; ADLERCREUTZ, H. (1992).

"Enterolactone and estradiol inhibit each other's proliferative effect on MCF-7 breast cancer cells in culture". J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. **41**: 615-619.

MUIR, A.D.; WESTCOTT, N.D. (2000).

"Quantitation of the lignan Secoisolariciresinol diglucoside in baked goods containing flax seed or flax meal". J. Agric. Food Chem. **48**: 4048-4052.

MURKOVIC, M.; PIIRONEN, V.; LAMPI, A.M.; KRAUSHOFER, T.; SONTAG, G. (2004). "Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil". Food Chem. **84**: 359-365.

NESBITT, P.D.; LAM, Y.; THOMPSON, L.U. (1999).

"Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed". Am. J. Clin. Nutr. **69**: 549-555.

OTTO, M. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-HPLC. In: Analytische Chemie. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1995; 453-459, 471.

PENALVO, J.L.; HAAJANEN, K.M.; BOTTING, N.; ADLERCREUTZ, H. (2005).

"Quantification of lignans in food using isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry". J. Agric. Food Chem. **53**: 9342-9347.

PRASAD, K (2000).

„Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, Enterodiol, and enterolactone". Int. J. Angiol. **9**: 220-225.

RAFFAELLI, B.; HOIKKALA, A.; LEPPÄLÄ, E.; WÄHÄLÄ, K. (2002).

"Review: Enterolignans". J. Chromatogr. B. **777**: 29-43.

RECORD, I.R.; JANNES, M.; DREOSTI, I.E.; KING, R.A. (1995).

"Induction of micronucleus formation in mouse splenocytes by the soy isoflavone genistein *in vitro* but not *in vivo*". Food Chem. Toxicol. **33**: 919-922.

REINLI, K.; BLOCK, G. (1996).

"Phytoestrogen content of foods – a compendium of literature values".

Nutr. Cancer. **26**: 123-148.

RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J.; SEIDL, M.M.; LUYENGI, L.; FONG, H.H.; THOMPSON, L.U. (1996). "Dose-dependent production of mammalian lignans in rats and in vitro from the purified precursor secoisolariciresinol diglycoside in flaxseed". J. Nutr. **126**: 2012–2019.

ROWLAND, I.R.; WISEMAN, H.; SANDERS, T.A.B; ADLERCREUTZ, H.; BOWEY, E.A. (2000). "Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora". Nutr. Cancer **36**: 27-32.

RUIZ-LARREA, B.M.; MOHAN, A.R.; PAGANGA, G.; MILLER, N.J.; BOTWELL, G.P.; RICE-EVANS, C.A. (1997). "Antioxidant Activity of Phytoestrogenic Isoflavones". Free Rad. Res. **26**: 63 – 70.

SCHWARTZ, H.; SONTAG, G. (2006).

"Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection". J. Chromatogr. B **838**: 78-85.

SETCHELL, K.D.R.; ADLERCREUTZ, H. (1979).

"The excretion of two new phenolic compounds during the human menstrual cycle and in pregnancy". J. Steroid Biochem. **11**: 15-16.

SETCHELL, K.D.R.; LAWSON, A. M.; MITCHELL, F.L.; ADLERCREUTZ, H.; KIRK, D.N.; AXELSON, M. (1980a). "Lignans in man and in animal species". Nature **287**: 740-742.

SETCHELL, K.D.R.; BULL, R.; ADLERCREUTZ, H. (1980b).

"Steroid excretion during the reproductive cycle and in pregnancy of the vervet monkey (*Cercopithecus aethiopus pygerythrus*)". J. Steroid. Biochem. **12**: 375-384.

SETCHELL, K.D.R.; LAWSON, A.M.; CONWAY, E.; TAYLOR, N.F.; KIRK, D.N.; COOLEY, G.; FARRANT, R.D.; WYNN, S.; AXELSON, M. (1981).

"The definitive identification of the lignans trans-2,3-bis(3-hydroxybenzyl)-gamma-butyrolactone and 2,3-bis(3-hydroxybenzyl)butane-1,4-diol in human and animal urine". Biochem. J. **197**: 447-458.

SETCHELL, K.D.R.; LAWSON, A.M.; BORRIELLO, S.P.; HARKNESS, R.; GORDON, H.; MORGAN, D.M.; KIRK, D.N.; ADLERCREUTZ, H.; ANDERSON, L.C.; AXELSON, M. (1981). "Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer". Lancet **2**: 4-7.

SETCHELL, K.D.R.; ADLERCREUTZ, H. (1988).

"Mammalian lignans and phytoestrogens: recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease". In: Rowland, I.R. (ed.), Role of the gut flora in toxicity and cancer. Academic Press, Inc., San Diego, CA: 315-345.

SKOOG, D. A.; LEARY, J. J. Einführung in chromatographische Trennmethode; Massenspektrometrie (MS). In: Instrumentelle Analytik; Grundlagen - Geräte - Anwendungen. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1996; 623; 627-629; 455; 457-467;

SMEDS, A.I.; EKLUND, P.C.; SJÖHOLM, R.E.; WILLFÖR, S.M.; NISHIBE, S.; DEYAMA, T.; HOLMBOM, B.R. (2007). "Quantification of a broad spectrum of lignans in cereals, oilseeds and nuts". J. Agric. Food Chem. **55**: 1337-1346.

STEINMETZ, K.A.; POTTER, J.D. (1991b).

"Vegetables, fruits and cancer. II. Mechanism". Cancer Caus. Control. **2**: 427-442.

STITCH, S.R.; TOUMBA, J.K.; GROEN, B.M.; FUNKE, C.W. ; LEEMHUIS, J.; VINK, J.; WOODS, G.F. (1980).

"Excretion, isolation and structure of a new phenolic constituent of female urine". Nature **287** : 738-740.

STRUIJS, K.; VINCKEN, J.P.; VERHOEF, R.; VORAGEN, A.G.J.; GRUPPEN, H. (2008). "Hydroxycinnamic acids are ester-linked directly to glycosyl moieties within the lignan macromolecule from flaxseed hulls". Phytochem. **69**: 1250-1260.

TANG, B.Y.; ADAMS, N.R. (1980).

"Effect of equol on estrogen receptors and on synthesis of DNA and protein in the immature rat uterus". J. Endocrinol. **85**: 291-296.

THOMPSON, L.U.; ROBB, P.; SERRAINO, M.; CHEUNG, F. (1991). "Mammalian lignan production from various foods." Nutr. Cancer **16**: 43-52.

THOMPSON, L.U.; SEIDL, M.M.; RICKARD, S.E.; FONG, H.H.S. (1996).

"Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed". Nutr. Cancer **26**: 159-165.

THOMPSON, L.U.; RICKARD, S.E.; ORCHESON, L.J.; SEIDL, M.M. (1996b).

"Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis". Carcinogenesis **17**: 1373-1376.

THOMPSON, L.U.; CHEN, J.M.; LI, T.; STRASSER-WEIPPL, K.; GOSS, P.E. (2005). "Dietary flaxseed alters tumor biological markers in postmenopausal breast cancer". Clin. Canc. Res. **11**: 3828-3835.

THOMPSON, L.U.; BOUCHER, B.; LIU, Z.; COTTERCHIO, M.C.; KREIGER, N. (2006). "Phytoestrogens of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans and coumestans". Nutr. Cancer **54**: 184-201.

TIKKANEN, M.J.; WÄHÄLÄ, K.; OJALA, S.; VIHMA, V.; ADLERCREUTZ, H. (1998). "Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance". Proc. Nad. Acad. Sci. **95**: 3106-3110.

UMEZAWA, T. (2003). "Diversity in lignan biosynthesis". Phytochem. Rev. **2**: 371-390.

VANHARANTA, M.; VOUTILAINEN, S.; LAKKA, T.A.; VAN DER LEE, M.; ADLERCREUTZ, H.; SALONEN, J.T. (1999). "Association between low serum enterolactone and increased plasma F2-isoprostanes, a measure of lipid peroxidation". Lancet **354**: 2112-2115.

WANG, L. (2002).

"Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone". J. Chromatogr. B **777**: 289-309.

WANG, H.; CAO, g.; PRIOR, R.L. (1996).

"Total antioxidant capacity of fruits". J. Agric .Food Chem. **44**: 701-705.

WATERS, A. P.; KNOWLER, J. T. (1982).

"Effect of a lignan (HPMF) on RNA synthesis in the rat uterus". J. Reprod. Fert. **66**: 379-381.

WATZL, B.; LEITZMANN, C. Phytoöstrogene. In: Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 2005: 41-45; 91-96; 118.

WEI, H.; WEI, L.; FRENKEL, K.; BOWEN, R.; BARNES, S. (1993).

"Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein". Nutr. Cancer **20**: 1-12.

WEI, H.; CAI, Q.; RHAN, R. (1996).

"Inhibition of Fenton reaction and UV light-induced oxidative DNA damage by soybean isoflavone genistein". Carcinogenesis **17**: 73-77.

WEN-HUEY, W. (2007).

"The contents of lignans in commercial sesame oils of Taiwan and their changes during heating". Food Chem. **104**: 341-344.

XIN, L.; JIAN-PING Y.; SHI-PING X.; JIANG-HAI W.; XIN L. (2008). "Separation and determination of secoisolariciresinol diglucoside oligomers and their hydrolysates in the flaxseed extract by high-performance liquid chromatography". J. Chromatogr. A. **1185**: 223-232.

SIGRID REIMER

Wiesenweg 3a
2191 Gaweinstal
Tel: 0676/87831682
E-Mail: sigrid.reimer@gmx.at
22.3.1985, Wien
Nationalität: Österreich

**LEBENS LAUF (CURRICULUM VITAE)**

AUSBILDUNG**ab 10/2003 – voraussichtlich 01/2009:**

Studium der Ernährungswissenschaften, Universität
Wien, Schwerpunkt: Lebensmittelproduktion
und –technologie
Diplomarbeitstitel: „Entwicklung einer optimalen
Aufarbeitungsmethode für Lignane im Leinsamen
unter Betrachtung von gerösteten und ungerösteten
Proben.“ Institut für analytische Chemie und
Lebensmittelchemie, Wien

1999 – 2003:

Bundesoberstufenrealgymnasium BORG, Mistelbach

BERUFSBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN**03/2008 – 06/2008:**

Lebensmittelchemisches Praktikum, Universität Wien
Tätigkeit: Tutorin

10/2007:

Jungbunzlauer, Austria AG
Xanthan – Labor

07/2007:

forum.ernährung heute: Administrative Tätigkeiten,
Literaturrecherche, Erstellung von Web-Texten,
Content-Management

01/2007:

Department für Lebensmittelbiotechnologie
(Muthgasse) Enzymforschung (Labor)

04/2006 – 06/2007:

Gemeinschaftsverpflegung: Restaurant HAAS
Speiseplanerstellung, Speisen- bzw.
Getränkeausgabe

2006:

AKH Wien: Projekt: Gesünder essen in Wiener
Volksschulen
Projekt: Nutrition Day

01/2005:

Hygieneinstitut: Lebensmittel- u. Wasserhygiene

10/2004 – 04/2005:

FESSEL – GfK: Institut für Marktforschung

SONSTIGE KENNTNISSE**EDV – Kenntnisse:**

Microsoft Office, Erfahrung mit Datenbankrecherchen

Sprachen:

Englisch – fließend in Wort und Schrift

Fortbildung: Französisch – Schulkenntnisse
Rhetorikkurs u. Persönlichkeitstraining
(Konservatorium Wien)
Methoden: Anwendung von Trennungsmethoden mittels HPLC
Detektion von Substanzen mittels ESI-MS
(Ionenfallenmassenspektrometer)

Als Referenz steht gerne zur Verfügung

Telefon Univ. Prof. Dr. Gerhard Sontag
Email Institut für analytische Chemie und
Lebensmittelchemie, Universität Wien
Währingerstraße 38, 1090 Wien
+43 (01) 4277 52303
gerhard.sontag@univie.ac.at

HOBBIES

Reisen, Snowboarden, Singen, Musizieren (Klavier, Gitarre)